

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480031589.6

[51] Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A23L 1/0522 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 27 日

[11] 公开号 CN 1886507A

[22] 申请日 2004.10.27

[21] 申请号 200480031589.6

[30] 优先权

[32] 2003.10.27 [33] US [31] 60/515,102

[86] 国际申请 PCT/AU2004/001517 2004.10.27

[87] 国际公布 WO2005/040381 英 2005.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.26

[71] 申请人 联邦科技产业研究组织

地址 澳大利亚卡姆贝尔

[72] 发明人 中易·李 马太·肯尼迪·莫维尔  
萨德奎·拉曼

[74] 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司

代理人 高占元

权利要求书 5 页 说明书 49 页 序列表 3 页  
附图 11 页

## [54] 发明名称

淀粉中具有增加了直链淀粉含量的水稻及水稻制品

## [57] 摘要

本发明涉及一种具有降低了淀粉分支酶水平的水稻，其产出的谷粒的胚乳具有相对高的直链淀粉含量。本发明的水稻谷粒尽管支链淀粉合成路径受损，但是是不缩水的显形，其可以是转基因的，也可以是非转基因的。

```
1  GCGAGGAGCA  TGGGCTGGAA  TGGTGGGCTT  GAGCTGCTCT  TGGGCTGGG  GCGGCGCTCC
61  GCGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  GCGGCTGGG  GCGGCTGGG  GCGGCTGGG
121  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
181  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
241  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
301  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
361  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
421  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
481  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
541  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
601  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
661  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
721  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
781  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
841  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
901  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
961  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1021  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1081  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1141  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1201  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1261  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1321  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1381  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1441  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1501  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1561  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1621  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1681  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1741  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1801  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1861  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1921  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
1981  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2041  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2101  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2161  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2221  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2281  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2341  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2401  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2461  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2521  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2581  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2641  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
2701  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG  TGGGCTGGG
```

1、一种从水稻作物中获得的谷粒，其中包含淀粉，其特征在于，所述谷粒的淀粉中直链淀粉的比例是至少 40%。

2、根据权利要求 1 所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒包括两种或多种遗传变种，其中一种遗传变种是选自：

a) 具有抑制 SBEIIa 表达和/或活性的 SBEIIa 基因突变，和

b) 被引入了具有抑制 SBEIIa 表达和/或活性的的核酸；

第二种遗传变种是选自：

c) 具有抑制 SBEIIb 表达和/或活性的 SBEIIb 基因突变，和

d) 被引入了具有抑制 SBEIIb 表达和/或活性的核酸。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒包含降低了水平的 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质和/或活性。

4、根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒的淀粉中直链淀粉的比例是至少 50%。

5、根据权利要求 1 至 4 任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒中包含转基因。

6、根据权利要求 5 所述的谷粒，其特征在于，所述转基因对反义、共抑制、核酶或双 RNA 分子进行编码。

7、根据权利要求 1 至 4 任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒是非转基因的。

8、根据权利要求 2 至 7 任意一项所述的谷粒，其特征在于，还包括降低了水平的 SBEI 蛋白质和/或活性。

9、根据权利要求 1 至 8 任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒包含改变了水平和/或酶活性的 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶、SSI、SSII、SSIII、异淀粉脱麸酶和普鲁兰脱麸酶。

10、根据权利要求 9 所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒包含改变了水平的 GBSS 蛋白质和/或酶活性。

11、根据权利要求1至10任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒是不缩水的。

12、根据权利要求1至11任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒是平均粒重是至少25mg的糙米。

13、根据权利要求1至12任意一项所述的谷粒，其特征在于，在偏振光下观察时，所述谷粒的淀粉颗粒中至少50%不显出双折射。

14、根据权利要求1至13任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒的淀粉含量至少是等同的、未经改造的谷粒中淀粉含量的90%。

15、根据权利要求2至14任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒包含SBEIIa和SBEIIb的无效突变。

16、根据权利要求1至15任意一项所述的谷粒，其特征在于，所述谷粒是籼稻或者其中包含Wx<sup>a</sup>等位基因。

17、一种能产出权利要求1至16任意一项所述谷粒的水稻作物。

18、一种从权利要求1至16任意一项所述谷粒中提取的淀粉颗粒。

19、一种从权利要求1至16任意一项所述谷粒中提取的淀粉。

20、一种含有从权利要求1至16任意一项所述谷粒中产出的面粉或淀粉制品的产品。

21、根据权利要求20所述的产品，其特征在于，所述面粉或淀粉与来自其他来源的面粉或淀粉相混合。

22、根据权利要求20所述的产品，其特征在于，所述产品其是非食品产品。

23、一种含有权利要求19所述的淀粉以及其他食品成分或水的组合物。

24、一种生产能够产出谷粒的水稻作物的方法，所述谷粒淀粉中包含至少40%的直链淀粉，其特征在于，该方法包括以下步骤：

a) 将基因变种引入到母体水稻作物或者种子里；和

b) 识别母体水稻作物的后代水稻作物或种子，所述后代作物或种子的淀粉中直链淀粉含量至少是40%。

25、根据权利要求24所述的方法，其特征在于，所述后代水稻作物包括

2 种或多种遗传变种，其中一种遗传变种是选自：

e) 具有抑制 SBEIIa 表达和/或活性的 SBEIIa 基因突变，和

f) 被引入了具有抑制 SBEIIa 表达和/或活性的核酸；

第二种基因变种是选自：

g) 具有抑制 SBEIIb 表达和/或活性的 SBEIIb 基因突变，和

h) 被引入了具有抑制 SBEIIb 表达和/或活性的核酸。

26、根据权利要求 24 或 25 所述的方法，其特征在于，所述遗传变种导致水稻作物的胚乳中 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质和/或活性的降低。

27、根据权利要求 24 或 27 所述的方法，其特征在于，所述引入遗传变种的步骤包括引入外来核酸。

28、根据权利要求 27 所述的方法，其特征在于，水稻细胞被引入所述外来核酸后再生成水稻植株。

29、根据权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述外来核酸对 SBEIIa 和/或 SBEIIb 的表达和/或活性的抑制子进行编码。

30、根据权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述抑制子可以是反义、共抑制、核酶或双 RNA 分子。

31、根据权利要求 24 至 25 中任意一项所述的方法，其特征在于，所述引入遗传变种的步骤包括采用化学试剂或辐射来形成水稻作物母体或种子的变异。

32、根据权利要求 25 至 31 中任意一项所述的方法，其特征在于，所述后代水稻植株中包含 SBEIIa 和/或 SBEIIb 的无效变异。

33、根据权利要求 25 至 32 中任意一项所述的方法，其特征在于，所述引入遗传变种的步骤还导致 SBEI 蛋白质和/或活性水平的降低。

34、根据权利要求 24 或 25 所述的方法，其特征在于，所述后代植株根据谷粒淀粉中直链淀粉水平来识别，或者根据后代植株的胚乳中 SBEIIa 和/或 SBEIIb 蛋白质和/或活性的水平的降低来识别。

35、根据权利要求 24 至 34 中任意一项所述的方法，其特征在于，所述方法还包括将  $Wx^a$  等位基因引入到水稻植株中。



36、根据权利要求 35 所述的方法，其特征在于，所述  $Wx^a$  等位基因通过杂交而引入的。

37、一种产出其胚乳中具有降低了水平的 SBEIIa 蛋白质和 SBEII 蛋白质和/或酶活性的水稻植株的方法，其特征在于，包含以下步骤：

- a) 诱变具有降低水平的 SBEIIa 蛋白质和/或酶活性的种子；或
- b) 诱变具有降低水平的 SBEIIb 蛋白质和/或酶活性的种子；或
- c) 使用具有降低水平的 SBEIIb 蛋白质和/或酶活性的种子与具有降低水平的 SBEIIa 蛋白和/或酶活性的种子进行杂交；和
- d) 识别出胚乳中含有降低的 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质活性和/或酶活性的水稻植株。

38、根据权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述识别水稻植株的步骤包括：筛选出具有分子标记的种子，所述的分子标记分别链接到 SBEIIa 或 SBEIIb 基因；根据是否有来自筛选具有分子标记链接的信号来识别所述植株。

39、根据权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述鉴定水稻植株的步骤包括：从具有抗体的水稻植株中筛选种子，所述抗体结合水稻的 SBEIIa 或 SBEIIb 蛋白质；然后根据是否存在抗体结合来识别所述植株。

40、一种产出改性后的水稻淀粉的方法，其特征在于，包括从权利要求 1 至 16 任意一项所述的谷粒中提取淀粉的步骤。

41、一种产生水稻植株的方法，所述水稻植株具有降低水平的 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质和/或活性，该方法使用两种或多种外来核酸分子，其中，至少一种所述的外来核酸分子编码水稻 SBEIIa 表达的抑制子和/或活性，且至少另外一种所述的外来核算分子编码水稻 SBEIIb 表达的抑制子和/或活性。

42、根据权利要求 41 所述的方法，其特征在于，所述抑制子是选自反义分子、共抑制分子、核酶、双 RNA 分子及其组合。

43、一种被分离的核酸分子，其对水稻 SBEIIa 的抑制子和水稻 SBEIIb 的抑制子进行编码，该两种抑制子可以相同，也可以不同。

44、一种包括权利要求 43 所述的被分离的核酸分子的载体。

45、一种包括权利要求 43 所述的被分离的核酸分子的细胞。

46、根据权利要求 45 所述的细胞是水稻细胞。

47、一种包括权利要求 43 所述的被分离的核酸分子的转基因水稻作物。

## 淀粉中具有增加了直链淀粉含量的水稻及水稻制品

### 技术领域

本发明涉及一种谷粒淀粉中直链淀粉含量相对较高的水稻作物。本发明还涉及一种胚乳中降低了淀粉分支酶 IIa (SBEIIa) 活性的水稻作物。本发明还涉及由此而获得的谷粒、淀粉及其食物、非食物制品。

### 背景技术

谷类淀粉中包含有两种分子类型：直链淀粉和分支淀粉。直链淀粉本质上是由  $\alpha$ -1,4 链接葡萄糖单元组成的线性分子，而支链淀粉是高度分支的连接在直链上的  $\alpha$ -1,6 葡萄糖甙键。

高等植物的胚乳中，淀粉的合成是通过在四个关键的步骤起催化作用的一系列酶来完成的。第一步，通过将 G-1-P 和 ATP 合成 ADP-葡萄糖，由 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, ADGP) 活化淀粉的单体前体。第二步，活化后的葡萄糖糖供体——ADP-葡萄糖——通过淀粉合酶被转换成预先存在的  $\alpha$ -1,4 键的非还原性的末端。第三步，淀粉分支酶 (starch branching enzymes, SBE) 把由葡聚糖连接的  $\alpha$ -1,4 区劈开，插入分支点，随后将裂开的链转换为受体链，形成新的  $\alpha$ -1,6 键。SBE 是唯一一种能将  $\alpha$ -1,6 键插入  $\alpha$ -聚葡萄糖的酶，因而在支链淀粉的形成过程中起着非常关键的作用。最后一步，淀粉分支酶去掉一部份分支链，尽管其中得机理尚未被解决 (Myers et al., 2000)。但是，很清楚的是，高等植物的常规淀粉颗粒的合成过程，至少包括以上四个行为，在突变分析 (Wang et al, 1998a, Buleon et al., 1998) 或者在通过基因改造的方法来修改基因表达水平 (Abel et al., 1996, Jobling et al., 1999, Scwall et al., 2000) 时，在高等作物胚乳中，上述四个行为的每一行为中都发现有多元同源异构体，每个同源异构体被认为有特定的作用。然而，目前还不清楚每个同源异构体对淀粉生物合成的确切贡献，也不知道在不同

物种之间这些贡献是否会显著地不同。

谷类的胚乳中存在两种 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶的同源异构体：一个是淀粉质体形式，另一个是细胞质形式（Denyer et al., 1996, Thorbjornsen et al., 1996）。每种形式都包含着两个亚组类型。玉米中的缩水突变（sh2）和易碎突变（bt2），分别表现出大亚组和小亚组的病症（Giroux and Hannan, 1994）。在谷类胚乳中，发现有四类淀粉合成酶，一种同源异构体排他性地位于淀粉颗粒、颗粒结合型淀粉合成酶（GBSS）中，有两种被分隔在颗粒和可溶片段之间（SSI, Li et al., 1999a, SSII, Li et al., 1999b），第四种完全位于可溶片段——SSIII 之中（Cao et al., 2000, Li et al., 1999b, Li et al., 2000）。GBSS 在直链淀粉合成过程起着很重要的作用（Shure et al., 1983），而 SSII 和 SSIII 之间的突变改变了支链淀粉的结构（Gao et al., 1998, Craig et al., 1998）。目前已经有水稻 GBSS（蜡质）基因的描述（Wang et al., 1990）以及用反义方法抑制其表达（Terada et al., 2000）。蜡质基因在胚乳及花粉中有表达但在水稻的其他器官中却没有表达（Hirano and Sano, 2000）。

植物中有两种主要的淀粉分支酶（Starch Branching Enzyme, SBE）：SBEI 和 SBEII。在谷类中，SBEII 还分成两种类型：SBEIIa 和 SBEIIb（Boyer and Preiss, 1978; Gao et al., 1996; Fisher et al., 1996; Hedman and Boyer, 1982; Mizuno et al., 1992; Sun et al., 1997; Sun et al., 1998）。据报道，在其它谷类中也有其他类型的 SBE，如小麦中推定的 149kDa SBEI（Baga et al., 2000）和大麦中的 50/51kDa SBE（Sun et al., 1996）。水稻（Nakamura and Yamanouchi, 1992; Mizuno et al., 1992; Mizuno et al., 1993; Mizuno et al., 2001）、玉米（Baba et al., 1991; Fisher et al., 1993; Gao et al., 1997）和小麦（Repellin et al., 1997; Nair et al., 1997; Rahman et al., 1997）以及其他谷类的基因组和 cDNA 序列已经被表征。序列排列显示，核苷酸水平与氨基酸水平同时具有的高度序列相似性，使得 SBEI、SBEIIa、SBEIIb 能被分组。SBEIIa 和 SBEIIb 通常表现出 80% 的序列等同性，特别是基因的中心区域。

SBEIIa 和 SBEIIb 也可根据他们的表达模式来区分，包括时间上和空间上，在胚乳及其他组织中。SBEI 在小麦和玉米的中期胚乳发展阶段表现



(Morell et al., 1997)。相反，SBEIIa 和 SBEIIb 在早期的胚乳发展阶段表现。在玉米中，SBEIIb 是胚乳的主要形式，而 SBEIIb 在叶子上有较高的表达水平 (Gao et al., 1997)。在水稻中，发现 SBEIIa 和 SBEIIb 在胚乳中的含量大致相同 (Yamanouchi and Nakamura, 1992)。然而，这两者的表达时间和表达组织各不相同。SBEIIa 在种子成长的早期表达，通常在开花后 3 天 (3 days after flowering, 3 DAF) 被检测到，而且是在叶子中表达；但是在 3DAF 时检测不到 SBEIIb，在 7-10 DAF 时在成长的种子中发现大量的 SBEIIb，却不在叶子中表达 (Mizuno et al., 2001)。在小麦胚乳中，发现 SBEI (Morell et al, 1997) 排他性地出现在可溶片段里，而 SBEIIa 和 SBEIIb 则在可溶片段和淀粉颗粒联合片段中 (Rahman et al., 1995) 都出现。

高等植物中存在两种分支脱支酶，根据其底物专一性定义为异淀粉酶型脱支酶和支链淀粉型脱支酶 (Myers et al., 2000)。玉米和小麦的 1-含糖 (Sugary-1) 突变与该两种脱支酶的缺失有关 (James et al., 1995, Kubo et al., 1999)，然而其因果突变基因图谱与异淀粉酶型脱支酶基因却处于相同位置。水稻中，反义异淀粉酶抑制改变了直链淀粉的结构及淀粉的性质 (Fujita et al., 2003)，这表明在支链淀粉的生物合成中需要用到异淀粉酶。

表 1 中列出了从谷类中克隆的代表性淀粉分支酶基因。

表 1 谷类包括水稻的淀粉分支酶基因表征

种类	SBE 同源 异构体	克隆类型	编号	参考文献
水稻	SBEI	cDNA	D10752	Nakamura and Yamanouchi, 1992
	SBEI	基因组	D10838	Kawasaki et al., 1993
	RBE3	cDNA	D16201	Mizuno et al., 1993
	RBE4	cDNA	AB023498	Mizuno et al., 2001
玉米	SBEI	cDNA	U17897	Fisher et al., 1995
		基因组	AF072724	Kim et al., 1998a
	SBEIIb	cDNA	L08065	Fisher et al., 1993
		基因组	AF072725	Kim et al., 1998
	SBEIIa	cDNA	U65948	Gao et al., 1997
小麦	SBEII	cDNA	Y11282	Nair et al., 1997

	SBEI	cDNA 和 基因组	AJ237897 SBEI 基因) AF002821 (SBEI 假基因 AF076680 (SBEI 基因) AF076679 (SBEI cDNA)	Baga et al., 1999 Rahman et al., 1997,  Rahman et al., 1999
	SBEI	cDNA	Y12320	Repellin et al., 1997
	SBEIIa	cDNA 和 基因组	AF338432 (cDNA) AF338431 (基因)	Rahman et al., 2001
	SBEIIb	cDNA 和 基因组		WO 01/62934
	SBEIIb	cDNA		WO 00/15810
大麦	SBEIIa 和 SBEIIb	cDNA 和 基因组	AF064563 (SBEIIb 基因) AF064561 (SBEIIb cDNA) AF064562 (SBEIIa 基因) AF064560 (SBEIIa cDNA)	Sun et al., 1998

玉米和水稻中，高直链淀粉显型表明是 SBEIIb 基因损伤而导致的，也被称为直链淀粉补充剂（amylose extender, ae）基因，（Boyer and Preiss, 1981, Mizuno et al., 1993; Nishi et al., 2001）。在这些 SBEIIb 突突变中，谷类淀粉胚乳显示出反常的形态，直链淀粉的含量显著地提高，残余的的支链淀粉的分支率降低，短链（<DP 17，尤其是 DP 8-12）的比例下降。此外，淀粉的糊化温度升高。另外，还存在一个相当数量的原料集中区域，被称为直链淀粉和支链淀粉之间的“中间体”（Boyer et al.,1980,Takeda,et al.,1993b）。水稻中，SBEIIb 的失活导致直链淀粉含量约为 25%，而野生水稻直链淀粉含量约为 18%（Nishi et al., 2001）。

相反，玉米植物的 SBEIIa 基因突变取决于增变基因（Mu）插入元导致蛋白质表达中缺乏 SBEIIa，它与野生玉米在胚乳淀粉的分支上难以被区别开来（Baluth et al.,2001），尽管它们在叶片淀粉中发生了改变。同样地，缺失 SBEIIa 活性的稻类作物在胚乳中的支链淀粉链属性上没有明显的改变（Nakamura 2002）。在玉米和水稻中，SBEIIa 和 SBEIIb 基因在基因组中都没有连环遗传。

目前已知有多种高直链淀粉的玉米品种。低支链淀粉的（low amylopectin starch, LAPS）玉米淀粉中有非常高的直链淀粉含量（>90%）已经通过大量地减少 SBEI 的活性以及几乎完全丧失 SBEII 活性的方法来获得(Sidebottom et al., 1998)。

马铃薯中，使用反义方法降低块茎中主要的 SBE（SBE B，等价于 SBEI），

能导致一些异常的淀粉特性，但不改变直链淀粉含量（Saffor et al., 1998）。对较少形式的 SBE（SBE A, 类似于谷类的 SBEII）进行反以抑制，导致直链淀粉的适当升高至 38%（Jobling et al., 1999）。然而，同时降低 SBEII 和 SBEI 比单独降低 SBEII 对直链淀粉含量带来更大的提高，提高至 60-89%（Schwall et al., 2000）。

小麦中，完全缺失 SGP-1（SSII）蛋白的变异改变了支链淀粉的结构，使淀粉颗粒变形，使淀粉的直链淀粉含量增加到约 30-37%，这比野生种类的小麦增加了约 8%（Yamamori et al., 2000）。直链淀粉通过比色测量、电流滴定（两者都是碘结合）和伴刀豆球蛋白 A（concanavalin A）方法测定。比较于相同的、没有突变的作物，SSII 无效突变（SSII null mutant）的淀粉表现出糊化温度下降，谷粒的淀粉含量从野外的 60%减少到低于 50%。

玉米中，不活泼突变（*dull1* mutation）引起胚乳中淀粉含量的下降以及直链淀粉含量的升高，改变的范围取决于遗传本底遗传本底，以及剩下的支链淀粉的分支率提高程度（Shannon and Garwood, 1984）。相应的突变基因可采用转位增变基因（Mu）通过转位标签法进行识别和分离，并表明可对被指定的淀粉合成酶（SSII）进行编码（Gao et al., 1998）。该被指定的 SSII 酶现在已被认知是谷类 SSIII 家族的成员（Li et al., 2003）。突变的胚乳中，SBEIIa 活性的降低与不活泼突变有关。目前不知道这些发现是否与其他谷类作物相关，如水稻。

一系列的谷粒淀粉中直链淀粉含量增加的大麦已经被识别，这包括高直链淀粉冰川（High Amylose Glacier, AC38），其直链淀粉的相对含量为 45%；以及在 SSIIa 基因中用化学方法引入突变的大麦，其谷粒淀粉中直链淀粉含量增加到约 65-70%（WO 02/37955 A1; Morell et al., 2003）。这种淀粉表现出糊化温度的降低。

水稻（*Oryza sativa* L.）是发展国家中最重要的和广泛种植的谷类植物，尤其在亚洲，水稻产量占全球的 90%左右。

淀粉被广泛用于食品、纸张和化学工业中。淀粉的物理结构，对淀粉的营养特性和其在食品、非食用产品或工业产品中的加工特性有重大影响。某

些特征是由淀粉的物理结构造成的，包括支链淀粉链长的分布、结晶的类型和程度，其他特性如糊化温度、粘性和膨胀体积等。支链淀粉链长的改变是结晶的改变、糊化的改变或支链淀粉退化的指示。。

淀粉组合物，特别是抗性淀粉，具有高含量的直链淀粉，对肠胃特别是大肠的健康，有重要的影响。因此，作为食品以促进肠胃的健康，已开发了特定的谷物如玉米，使其含有较高的直链淀粉含量。抗性淀粉的营养效果，主要体现在它给大肠提供营养储备。其中，肠微生物群发酵抗性淀粉，生成其他短链的脂肪酸而成为本身的能量源。这些短链脂肪酸给结肠粘膜细胞提供营养，促进大肠对营养的吸收，提高结肠的生理活性。通常，如果不对结肠提供抗性淀粉或其他食用纤维，结肠的代谢作用就会相对地钝化。

同时，经化学或其他方式改造的淀粉可以用来食用，以提供正常的、未经改造淀粉所没有的功能。这些加工处理，要么是修改其他价值成分，要么是去掉某些不需要的内容。因此，更可取的是提供以未经改造的形式存在的组分的食物源。

因此，淀粉中直链淀粉含量大于 40%的水稻仍然是未知的。虽然已经发现了高直链淀粉含量的玉米和大麦，而水稻种植区的国家希望有较高直链淀粉含量的水稻。这种水稻的淀粉是相对抗消化的，因此，较高直链淀粉含量的水稻被认为对大部分人的健康有很大的益处。

## 概要

本领域的技术人员都知道，本发明并不限于本说明书的描述，是可变更的和修改的。要知道，本发明在此描述的，包括这些变化和修改，还包括该文本所提及的和指出的单独或共同的所有的步骤、特征、组合物和化合物，也包括任何两个或两个以上的步骤/特征的组合。

通过本文本，“包括”和“包含”之类的词，要理解为包含规定的整体或步骤，但不排除其他的规定的整体或步骤，除非文中有特别说明。本发明不局限于所列举的实施例的范围。所列举的实施例，仅仅为了便于说明。功能相同的产品、合成物和方法都落入本发明的范围。



该文本后面，附有本发明参考过的公开发行的著录的详细资料列表。本说明书中提及的参考资料是指这些完整的资料。这些现有技术中的参考资料，包括任何一种或多种现有技术文件，并不认为是对其的承认，或建议。这些现有技术构成了普通的通用知识或形成了其中的一部分。

此处，“获得、取得、源于”之类的词，应被认为是表示某特定的整体来源于特定的种类，但是不要求是直接地获取。

该文本所涉及的核苷残留物的名称，都是 IUPAC-IUB 生物化学名称委员会（IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission）推荐的，其中，A 表示腺嘌呤（Adenine），C 表示胞嘧啶（Cytosine），G 表示鸟嘌呤（Guanine），T 表示腺嘧啶脱氧核苷（Thymidine）。

## 发明内容

本发明的第一方面提供一种从水稻作物中获得的谷粒，包括淀粉，其中该谷粒的淀粉中直链淀粉的百分比至少是 40%。优选地，该谷粒含有降低活性或水平的 SBEIIa 和 SBEIIb。在一种形式中，通过两种或多种基因变异获取所述谷粒，该基因变异是选自：a) 抑制 SBEIIa 表达和/或活性的 SBEIIa 基因突变，以及 b) 引入抑制 SBEIIa 表达和/或活性的核苷酸；第二种基因突变是选自：a) 抑制 SBEIIb 表达和/或活性的 SBEIIb 基因突变，和 b) 引入抑制 SBEIIb 表达和/或活性的核苷酸。

在一种形式的谷粒中包括转基因，该转基因可用于编码反义、共抑制、核酶或双 RNA 分子。此外，该谷粒可以是非转基因的，其抑制是来自染色体突变或重排列。该谷粒可包括 SBEIIa 和 SBEIIb 基因的无效突变。

该第一方面所要求的谷粒可包括降低了蛋白质水平和/或活性的 SBEIIa 和 SBEIIb。在一特定的形式中，该谷粒还包括降低了蛋白质水平和/或活性的 SBEI 或也有可能还包括改变了蛋白质水平和/或酶活性的 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶、GBSS、SSI、SSII、SSIII、异淀粉酶类型的脱麸酶和普鲁兰类型的脱麸酶。在另一特定形式中，该谷粒包括改变了蛋白质水平和/或酶活性的 GBSS。在另一可选的形式中，所述谷粒是籼稻（Indica）或者谷粒中包含 Wx<sup>a</sup> 等位基



因。

优选地，所述谷粒的淀粉中直链淀粉的含量是至少 50%。

优选地，所述谷粒是不缩水的，并且在一特定形式中，该谷粒是糙米，其平均粒重至少是 25 mg 左右，且优选地，其淀粉含量至少是未经改变的相同谷粒的淀粉含量的 90%。优选地，在偏振光下，该谷粒中至少 50%的淀粉颗粒没有双折射。

本发明的第二方面在于提供一种能产出本发明第一方面所述谷粒的水稻作物。

本发明的第三和第四方面涉及从本发明第一方面所述的谷粒中提取的淀粉及淀粉颗粒。

本发明第五方面涉及从本发明第一方面所述的谷粒所产出的面粉或淀粉产品。所述产品可包括所述面粉或淀粉与其他来源的面粉或淀粉的混合物。所述产品可以是食用产品或非食用产品。

本发明第六方面涉及本发明第三方面所述的淀粉与其他食物成分或水的组合物。

本发明第七方面涉及一种能产出淀粉中包括至少 40%的直链淀粉的谷粒的水稻作物的方法，包括以下步骤：a) 引入基因变种到母体水稻作物或者种子里；和 b) 识别母体水稻作物的后代水稻作物或种子，其中该后代作物或种子的淀粉中直链淀粉至少占 40%。优选地，基因变种导致了水稻胚乳中 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质和/或活性水平的降低。

优选地，该方法中的后代水稻作物包含至少两种基因变种，其中的一种基因变种是选自：a) 抑制 SBEIIa 表达和/或活性的 SBEIIa 基因变异，以及 b) 导入抑制 SBEIIa 表达和/或活性的核酸；其中的第二种基因变种是选自：a) 抑制 SBEIIb 表达和/或活性的 SBEIIb 基因变异，以及 b) 导入抑制 SBEIIb 表达和/或活性的核酸。

所述引入基因变种的步骤可以包括引入外来的核酸。该外来的核酸被引入到水稻细胞中并再生成水稻植株。优选地，该外来核酸编码 SBEIIa 和/或 SBEIIb 表达和/或活性的抑制子。所述抑制子可以是反义、共抑制、核酶或双

RNA 分子。

可选地，该引入基因变种的步骤中可包括采用化学试剂或辐射对水稻作物母体或种子进行突变变异。

所述后代水稻植株可包括 SBEIIa 和/或 SBEIIb 的无效变异。

所述引入基因变种的步骤可附加地导致 SBEI 蛋白质和/或活性水平的降低。

所述后代植株可根据谷粒淀粉中直链淀粉水平来鉴别，或者根据后代植株的胚乳中 SBEIIa 和/或 SBEIIb 蛋白质和/或活性的水平的降低来鉴别。

所述方法还包括将  $Wx^a$  等位基因引入到水稻植株中，例如通过杂交引入。

本发明的第八方面在于提供一种产生水稻植株的方法，所述水稻植株中具有同时降低了 SBEIIa 和 SBEII 蛋白质水平和/或酶活性的胚乳，包括以下步骤：

- a) 诱变具有降低 SBEIIa 蛋白质水平和/或酶活性的种子；或
- b) 诱变具有降低 SBEIIb 蛋白质水平和/或酶活性的种子；或
- c) 将具有降低 SBEIIb 蛋白质水平和/或酶活性的种子与具有降低 SBEIIa 蛋白质水平和/或酶活性的种子杂交；和
- d) 识别出胚乳中含有降低了 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质活性和/或酶活性的水稻植株。

所述识别水稻植株的步骤可包括筛选出具有分子标记的水稻植株，所述的分子标记分别链接在 SBEIIa 或 SBEIIb 基因；然后根据从对链接分子标记的筛选中是否存在信号来识别作物。

所述识别水稻植株的步骤可包括从在 SBEIIa 或 SBEIIb 蛋白上结合有抗体的水稻植株中筛选出种子，再根据是否存在抗体的结合来识别植株。

本发明还包括一种产出改变的水稻淀粉的方法，包括从本发明第一方面所述的谷粒中提取淀粉的步骤。

本发明还附加地包括使用两种或多种外来核酸分子，其中至少一种外来核酸分子编码水稻 SBEIIa 表达和/或活性的抑制子，且至少另外一种所述的外来核酸分子编码水稻 SBEIIb 表达和/或活性的抑制子，以产出具有降低了

SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质和/或活性水平的水稻植株。所述抑制子是选自反义分子、共抑制分子、核酶、双 RNA 分子及其组合。

本发明还包括用以编码水稻 SBEIIa 抑制子和水稻 SBEIIb 抑制子的单个核酸分子，该核酸分子可以是相同的或不同的分子。被分离的遗传媒介可以是载体。可以理解的是，本发明涉及包括所述单个核酸分子的细胞，优选水稻细胞。还可理解的是，本发明涉及一种包括所述单个核酸分子的转基因水稻植株。

### 附图简要说明

图 1 是具有水稻淀粉分支酶 I 基因编码 (SBEI) 的 cDNA 序列-基因库序列 D11082 (序列 ID. No.1);

图 2 是具有水稻淀粉分支酶 IIa (SBEIIa) 基因编码的 cDNA 序列-基因库序列 AB023498 (序列 ID. No.2);

图 3 是水稻淀粉分支酶 IIb (SBEIIb) 基因编码的 cDNA 序列-基因库序列 D16021 (序列 ID. No.3);

图 4 是 pRint9\_BC 质体的示意图, 该质体包括嵌入到 pBC SK-的水稻 SBEI 基因的基因内含子 9 的 500bp 片断;

图 5 是双 RNA 结构的示意图; 所采用的基因元的顺序是启动子、正义方向的 SBEIIa 或 SBEIIb cDNA 序列、内含子 (Rini9)、反义方向的 SBEIIa 或 SBEIIb cDNA 序列, 以及转录终结子/多聚腺苷酸化序列; SBEIIa 和 SBEIIb 基因的转录形成具有由正义和反义序列杂合而成的双绞合区“发夹式” (hairpin) RNA 结构。与 GT 和 AG 核苷毗接的内含子序列被剪除 (spliced out); 图中还示出了 pRBEI.IR (pBC SK- (正义/Rinit9/反义)) 示意图, 以及对应的 pRBEIIa.IR 和 pRBEIIb.IR 结构。

图 6 所示是质体载体 pBx17casNOT 的示意图;

图 7 所示是水稻 SBEIIa (序列 ID. NO.2) 和水稻 SBEIIb (序列 ID. NO.3) 的 cDNA 序列比较图。上面的是 SBEIIb 序列 (大写), 下面的是 SBEIIa 序列 (小写)。该图中没有示出 5' 和 3' 的末端序列, 因为它们没有显著的同源性。

图 8 所示是采用用于基因沉默结构的 SBEIIa、SBEIIb 和 SBEI 3'序列的基因沉默程序 (Gene Silencing program) 的爆破输出 (BLAST output)。

## 具体实施方式

### 产出水稻植株的方法

本发明的一个方面在于提供一种产出水稻植株的方法，该水稻植株的谷粒中含有经改造的淀粉，尤其是该淀粉的直链淀粉相对含量提高到至少 40%。此处对淀粉的直链淀粉相对含量的定义是基于重量百分含量 (w/w)，即直链淀粉的重量占淀粉重量的百分比。优选地，所述淀粉中直链淀粉的比例至少是 45%、50%、55%或 60%，更优选地，是至少 65%、70%或 75%。通常在水稻中，淀粉中直链淀粉的含量是 0 至 35%。所述方法包括降低水稻胚乳中淀粉分支酶 IIa (SBEIIa) 蛋白质水平和淀粉分支酶 IIb (SBEIIb) 蛋白质水平或酶活性。与未经改造的水稻胚乳中相应的蛋白质或活性水平相比，本发明中，蛋白质或活性至少降低 40%，更优选的是至少降低 60%，甚至至少 75%，特别优选地是至少降低 90%或 95%。在本发明的水稻胚乳中，该两种蛋白质中的一种或两种都有可能不被检测到。该方法还包括改变了 SBEIIa 和 SBEIIb 基因表达的水稻，或者包括水稻中 SBEIIa 和 SBEII 基因的突变，或者以上的组合。从而胚乳中 SBEIIa 和 SBEIIb 的活性都被降低。可通过引入核酸如转基因来抑制其中任何一种或同时两种基因的表达。

应当注意到，本文中的“提高”、“降低”、“减少”、“改变”等词语是比较性词语，用于本发明的作物或产品与对应的野生作物或产品的比较，所述野生作物或产品没有经本发明的方法改良。

此处，直链淀粉被定义为主要由由  $\alpha$ -1,4 吡喃型葡萄糖连接的、类直链淀粉的长链分支淀粉组成的线性分子 (有时也叫“中间材料”，“intermediate material”，Takeda et al., 1993b; Fergason, 1994)。直链淀粉的含量可以通过本领域内任何已知的方法来测定，包括尺寸排除的分子筛高效液法 (HPLC)，例如，90% (w/v) 的二甲基亚砷 (DMSO)，伴刀豆球蛋白 (concanavalin) A 方法 (Megazyme Int, Ireland)，最好是碘量法，如实例 1 中所述。HPLC 法可



以包括或不包括淀粉的脱支 (Batey and Curtin, 1996)。从谷粒的重量和直链淀粉的含量, 可以计算出每单位谷粒中直链淀粉的量, 并与基因改造和控制种系进行比较。

该方法包括检测水稻胚乳中 SBEIIa 和/或 SBEIIb 活性的步骤——最好是两者同时检测。例如, 这可通过测量蛋白质水平, 如采用免疫检测 (immunodetection) 法来实现, 或采用业内公知的方法如 RNA 印迹交分析法 (Northern blot hybridization analysis)、槽印迹交法 (slot-blot hybridization)、RNase 保护分析 (RNase protection assays)、微组合分析 (microarray analysis) 或反向转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 来测定其相应的蛋白质的 mRNA 水平。该方法还包括筛选胚乳中具有降低的 SBEIIa 和/或 SBEIIb 活性的水稻植株, 或包括选择/标识该植株或谷粒。该筛选/选择步骤可基于 SBEIIa 和/或 SBEIIb 活性或蛋白质水平的降低, 或者基于水稻植株的谷粒的显型, 如直链淀粉含量的增加或支链淀粉含量的降低, 或其他可视显型, 如缩水谷粒。

SBE 活性可以采用酶分析来测量, 例如, 通过磷酸化酶刺激分析法 (phosphorylase stimulation assay, Boyer and Preiss, 1978)。该方法用磷酸化酶结合葡萄糖 1-磷酸盐和  $\alpha$ -D-葡萄糖来测量 SBE 的刺激性。SBE 活性可以通过碘印迹法测量, 它所测量的是来源于葡萄糖聚合物的分支的葡萄糖-多碘聚合体的吸光率的降低。SBE 活性也可以用分支链分析法来测定, 该方法是测量底物上被减少了的直链淀粉的还原性端的产出, 再经异淀粉酶消化 (Takeda et al., 1993a)。更适宜地, SBE 活性是以 SBEI 活性的缺失来测定的。SBE 的同功异构体显示出不同的底物特异性。例如, SBEI 在分支直链淀粉中显示出更高的活性, 而 SBEIIa 和 SBEIIb 在分支的直链淀粉底物上显示出更高的活性。这些异构体也可根据所转换的葡聚糖链的长度来区分。SBE 蛋白质也可以采用此文描述的特定抗体来测量。在一优选的实施例中, SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质的水平可通过免疫方法, 如采用特别的抗体通过蛋白质印迹 (Western blotting) 或 ELISA 化验法来进行测定, 所述特别的抗体被培育成对应于水稻 SBEIIa 和 SBEIIb 的 N-末端氨基酸序列的多肽片断。SBEII 活性可以在胚乳发



育过程的谷粒成长时期测定，也可在没有被改良的成熟谷粒的等量的蛋白质中通过免疫化验方法来测定。

本发明的更进一方面在于提供一种改变、尤其是降低水稻胚乳中第三种淀粉生物合成酶活性的方法，并结合 SBEIIa 和 SBEIIb 活性的降低，使谷粒的淀粉中直链淀粉含量是至少 40%。优选地，胚乳中 SBEI 活性也被降低。其他与 SBEIIa 和 SBEIIb 结合的、可能被改变的淀粉生物合成酶是：SSI、SSII 或 SSIII。淀粉分支酶也可以被改变，如异淀粉酶或普鲁兰酶的活性。与未经改造的水稻相比，所述第三种淀粉生物合成酶活性可以被提高或被降低，最好是被降低，至少降低 40%，更优选地是降低至少 60%或 80%，特别优选地是 90%。

在另一个实施例中，淀粉生物合成酶的活性除了在作物的胚乳之外，也在其他组织中被改变，如叶片中 SBEI 或 SBEII 的活性，特别是 SBEIIa 活性，可以被增加以补偿植株基因变种所遭受的活性损失，该植株的基因变种造成胚乳中 SBEIIa 活性降低。基因变异不仅引起胚乳中 SBEIIa 活性的降低，也引起其他组织中特别是叶片中 SBEIIa 活性的降低时，是最佳的。这是因为胚乳以外的其他组织的活性补偿，例如，可由不在胚乳中表达的启动子控制之下而形成核酶编码区。所述启动子可以是光合作用相关的基因，如 *rbcS*。选择性地，通过 SBEIIa 和 SBEIIb 活性的减少再结合一个或多个淀粉生物合成酶的过度表达，可以进一步提高胚乳的淀粉合成。编码这种酶的基因具有多个来源，例如来自细菌或水稻之外的其他来源，而且可以对其进行改造以改变其催化属性，例如，改变酶的温度依赖性（见 WO 94/09144）。

高直链淀粉显型可通过部分地或全部地破坏 SBEIIa 和 SBEIIb 的基因表达来实现。本发明的方法中包括筛选或标识或选择具有 SBEIIa 和/或 SBEIIb 基因无效变异的水稻植株或谷粒。所述“无效变异”定义为导致所期望的植株器官尤其是胚乳中不可检测到蛋白质或核酶的突变。所述筛选/标识步骤因而包括基因水平的筛选，例如，筛选对 SBEIIa 和/或 SBEIIb 编码缺失的基因；也包括对所期望的基因表达水平的筛选。基因被抑制的程度在一定程度上决定了水稻谷粒中淀粉的特性。通过对引物采用 PCR 放大法可方便地筛选出这种

缺失，该引物被设计成使至少一部分放大产物区间（spans）至少跨越一部分所期望的基因。对从经过改造的水稻胚乳中提取的蛋白质进行的任何凝胶电泳技术将显出 SBEIIa 和 SBEIIb 活性的本性以及改性程度。所述改性可导致胚乳中 SBEIIa 和/或 SBEIIb 活性的降低或者核酶活性的完全消除。为实施这些实验，可从水稻胚乳中提取淀粉并分析其蛋白质。业内公知的技术如 SDS-PAGE 和免疫转渍(immunoblotting)，都可在淀粉颗粒碎片和溶液上实施，以识别出 SBEIIa 和 SBEIIb 核酶变性的植株或谷粒。

本发明的方法还包括将基因变种引入到水稻植株或者世系的水稻植株或种子。所述基因变种可包括下述转基因，或者经诱变，如化学诱变或辐射，引入的转基因。

### 水稻植物

本发明的另一方面在于提供一种水稻作物，该水稻作物的淀粉中，直链淀粉含量至少为 40%。所述水稻作物定义为任何的 *Oryza sativa* L 种类。该水稻作物可以是 *O. sativa* L. 的三个已知品种中的任意一种，即粳稻（Japonica）（或 sinica）、籼稻（Indica）和爪哇稻（Javanica），优选地是籼稻品种。每一品种都有很多栽培变种和亚种，都包含在本发明的植株中。优选的栽培变种生长在澳大利亚，包括，如栽培品种亚玛茹（Amaroo）、艾丽康蕃（Ali Combo）、笆斯玛蒂（Basmati）、蕃杆（Bogan）、蕃比芽（Bombia）、冬嘎喇（Doongara）、谷拉哈（Goolarah）、伊纳帮（Illabong）、加哈（Jarrah）、越光米（Koshihikari）、吉尔玛（Kyeema）、朗节（Langi）、米林（Millin）、纳玛葛（Namage）、澳派司（Opus）、蓓耳德（Pelde）。直链淀粉的含量优选地是至少 45%、50%、55%、60%、65%、70% 或 75%。所述水稻植物至少包括一种抑制胚乳中 SBEIIa 和/或 SBEIIb 表达和/或活性的基因变种。该基因变种可以是任何的基因变种，或者结合导致水稻胚乳中 SBEIIa 和 SBEIIb 活性和/或蛋白质减少的基因变异，如 SBEIIa 和 SBEIIb 基因的突变，被引入的核酸如编码反义、增强反义、共抑制的基因、核酶、双 RNA 或者类似的抑制 SBEIIa 和/或 SBEIIb 表达或活性的分子，以及其组合。所述基因变种优选地是无效变异。具有降低了 SBEIIa

和 SBEIIb 活性的植株可通过将 SBEIIb 减少的植株与 SBEIIa 减少的植株进行杂交而产出，或者引入对抑制 SBEIIa 和 SBEIIb 的基因表达的分子进行编码的转基因而获得。在优选的实施例中，所述水稻作物具有 SBEIIa 和 SBEIIb 的无效变异。

本发明还提供一种水稻作物，至少在谷粒生长的部分时期内，其胚乳中具有降低水平的 SBEIIa 和 SBEIIb 活性，该水稻作物产生的谷粒的淀粉与从等同的、未经改造的作物中提取的淀粉相比，具有提高的直链淀粉含量。与野生的相比，优选地，胚乳中 SBEIIa 和 SBEIIb 水平降低至少 50%，更优选地是至少 75%，特别优选地，是至少 90%或 95%。所述“野生”在基因领域具有其本意，包括未经本发明改良的基因型或水稻栽培变种。

本发明还提供一种后代作物和谷粒，所述后代作物和谷粒在基因型和/或显型上具有母体水稻作物的期望特性。本发明还涉及用于产出具有期望特性的水稻作物的繁殖材料，如栽培变种组织或细胞。

本发明改造的水稻植株可与具有更期望的遗传本底遗传本底的植株杂交，因此，本发明还包括具有其他遗传本底的变异。初次杂交后，可进行适当次数的回交以去除不太希望的本底。所述期望的遗传本底可包括适当的基因组合，所述基因具有商业收益和其他特性，如农业性能或非生物的抗压性等。所述遗传本底也可包括其他改造了的淀粉生物合成或改良基因，例如，胚乳缩水且致因基因尚未知道的其它水稻品种的基因。

在优选的实施例中，水稻植株中包括蜡质基因的  $Wx^a$  等位基因。该等位基因通常在水稻的籼稻品种中发现，而  $Wx^b$  等位基因通常在粳稻（Japonica）品种中发现。 $Wx^b$  等位基因在蜡质基因的第一基因内区的 5'结合点携带替换突变（GT 替换为 TT），而导致了比对应的包括  $Wx^a$  等位基因的作物更低的蜡质基因表达，因此导致更低的 GBSS 活性和更低的直链淀粉水平（Issshiki et al., 1998; Hirano et al., 1998; Frances et al., 1998）。

由此所得的作物和谷粒可以是转基因的或非转基因的。

## 谷粒



本发明还提供一种相对于等同的、未经改良的水稻作物而言淀粉成分被改变的水稻谷粒。在这里，谷粒被定义为本质上成熟的谷粒，包括出于商业目的而收割的谷粒。收割时，所述水稻谷粒可以是未加工的形式，其包括外壳；或者是“糙米”形式，其外壳已去除。只有糙米是可食用的。所述糙米包括果皮的外层、种皮和珠心、幼芽（胚芽）和胚乳。所述胚乳定义为包括糊粉层和严格意义上的胚乳，包括亚糊粉层（subaleurone layer）和含淀粉的或内部的胚乳。对糙米进行研磨或摩擦以去除果皮、种皮、外种皮、糊粉层和胚芽，可以获得去壳米（milled rice），其本质上包括含淀粉的胚乳。碾磨导致种皮和糊粉成分的损失，包括一定的脂肪、蛋白质、纤维、矿物质和维生素，所述维生素包括维生素 B1、维生素 B2、维生素 PP 和维生素 E。去壳米中，碳水化合物含量，主要是淀粉含量比糙米更高。碾磨后的野生水稻谷粒中包含 77-89%左右的碳水化合物，6.3-7.1%的蛋白质、1.5-1.7%的含淀粉（starch-bound）和不含淀粉（non-starch）形式的液体、0.3-0.8%的矿物质、0.3-0.5%的天然纤维、0.7-2.3%的中性洗涤剂纤维，还可包含 10-15%的水分。“水稻谷粒”或简单的“水稻”定义为包括未加工米、糙米和去壳米，优选地，是去壳米。

本发明的水稻谷粒包括至少一种基因变种，如在此所述的水稻谷粒是衍生出来的水稻植株。该基因变异导致水稻谷粒的胚乳中 SBEIIa 和 SBEIIb 活性和/或蛋白质的减少。与等同的、未经改良的作物的谷粒相比较，所述谷粒包含了增加的直链淀粉百分比（作为总淀粉含量的百分比）和减少的支链淀粉的百分比。去壳米的主要成分是淀粉，干的去壳米包含 90%左右的淀粉。未经本发明改良的水稻的胚乳淀粉中直链淀粉含量在 0-37%的范围，取决于其基因型。基于测定“表观直链淀粉含量”的碘量法（比色法），去壳米可分类为蜡质（1-2%的直链淀粉）、特低直链淀粉（2-12%）、低直链淀粉（12-20%）、中直链淀粉（20-25%）和高直链淀粉（25-33%）（Juliano, 1979,1985）。最近采用 HPLC 法的研究表明最大的实际直链淀粉含量约为 20%，其他的碘结合取决于支链淀粉的长线性链（Takeda et al., 1987）。此处的“直链淀粉含量”或“表观直链淀粉含量”定义为采用碘量法测定，或者业内公知的，如 Morrison 和

Laignelet (1983) 所述的分光光度法测定。当然其他方法如高性能液相色谱法 (HPLC, 例如 Batey 和 Curtin, 1996) 仅分析“实际直链淀粉”, 其可能会低估此处所定义的“直链淀粉含量”。

本发明的谷粒的淀粉中包含至少 40% (w/w) 的直链淀粉。优选地, 直链淀粉占总淀粉的百分比是至少 45%、50%或 55%的, 更优选地, 是 60%, 特别优选地, 是 65%、70%或 75%。在一优选的实施例中, 谷粒是非转基因的, 其淀粉中包含至少 40%的直链淀粉。可选择地, 所述谷粒具有降低水平的 SBEIIa 和 SBEIIb 蛋白质且其淀粉中含有至少 40%的直链淀粉。增加的直链淀粉水平可通过异常的淀粉颗粒形态证明, 或者通过在光学显微镜下观察淀粉颗粒的双折射损失来证明, 或者采用业内公知的其他方法来证明。

在一优选的实施例中, 所述水稻是籼稻品种, 或者包含蜡质基因的  $Wx^a$  等位基因。

所述谷粒所含有的淀粉可具有改变后的物理特性, 例如, 糊化温度和升高/降低, 和/或在电泳时或之后膨胀特性的改变。

所述的谷粒可以是缩水的或不缩水的, 最好是具有不缩水的显型。此处所说的“不缩水”被定义为大多数谷粒, 至少 90%的谷粒是饱满的, 具有丰满的或全填充的显型。这通常与淀粉集聚的正常或接近正常水平相关联。相比之下, 此处的“缩水”显形是对大多数谷粒而言, 至少 90%的谷粒的淀粉集聚都是降低了的。轻度缩水谷粒是指平均淀粉含量至少降低 30%, 中等缩水谷粒是指平均淀粉含量至少降低 50%, 高度缩水谷粒是指平均淀粉含量至少降低 70%。缩水率可以通过相对淀粉含量来测定, 如占谷粒重量的百分比。野生糙米的大小和形状参数定义如下: 超长,  $>7.50$  mm; 长, 6.61 至 7.50 mm; 中等, 5.51 至 6.60 mm; 短,  $<5.50$  mm。基于长与宽的比率特性将谷粒形状定义为: 细长,  $>3.0$ ; 中等, 2.1 至 3.0; 粗, 1.1 至 2.0; 圆,  $<1.0$ 。本发明的水稻谷粒中, 上述的每一个特性都可以被改变。

本发明还提供用该谷粒产出的粉、粗粉或其他产品。包括经加工或未加工, 如分馏, 漂白等。本发明还提供从本发明的水稻作物中取得的对食品生产有用的谷粒。此外, 本发明还包括以其他方式加工的谷粒, 如碾磨、碾碎、



成珠状、粗磨、裂碎、煮等。

### 淀粉

本发明的另一方面，提供一种从上述的水稻作物的谷粒中获得的淀粉或淀粉颗粒，其具有增加了的直链淀粉含量和降低了的支链淀粉含量。所述水稻作物的胚乳中具有减少的 SBEIIa 和 SBEIIb 活性水平。另外一方面，本发明提供一种从所述水稻植株的谷粒中获得的淀粉或淀粉颗粒，其包括至少 40%、50%、55%或 60%的直链淀粉，更优选地，是至少 65%、70%或 75%的直链淀粉。可以通过碾磨加工如湿磨法来获得纯淀粉。所述湿磨包括把淀粉与蛋白质、油类、纤维分离。碾磨加工后的最初产品是淀粉颗粒的混合物。因此，本发明包括这些颗粒。

野生品种水稻的淀粉颗粒是多边形的，并且尺寸在 3 到 9 微米之间，平均单峰分布（unimodal distribution）尺寸在 5 微米左右。蛋白质主要以尺寸在 0.5 至 4 微米的球形蛋白质形式而存在于整个胚乳之中。

所述的淀粉具有提高或减少了的糊化温度，优选提高了的糊化温度。相比较于从相似的、未经改良的谷粒提取的淀粉，用 DSC 法测量的糊化温度尤其是第一峰值的起点温度或第一峰值的顶点温度至少升高了 3°C，优选地是至少 5°C，更优选地，是 7°C。所述的淀粉中还可包括提高了的抗性淀粉水平，结构的改变显示出以下一项或多项特定的物理性质：消化酶的物理难接近性，这可能是因为淀粉颗粒形态的改变、与脂类相关联的淀粉的存在、结晶度的改变或分支淀粉分布链长度的改变。较高的直链淀粉含量，对抗性淀粉的水平也有贡献。

本发明还提供一种从实施例的水稻作物的谷粒中获得的淀粉。所述谷粒中食用纤维的含量增加了，优选地，抗性淀粉的水平也同时升高。这些增加，至少部分导致了直链淀粉含量的提高。

### 减少基因活性的方法：转基因

可以通过引入一个或多个基因变种到水稻作物中改变其 SBEIIa 和 SBEIIb 或者其他淀粉合成、修改基因的活性。也可以通过引入转基因到该水稻作物

中的方式来实现。所述“基因变种”是基因组上的任何改变，在这里，所述改变引起 SBEIIa 和 SBEII 活性的减少，还可选择性地引起其他淀粉生物合成或改良基因活性的减少。该基因变种包括包括点突变、点置换、点复制、点迁移，优选地，包括点的缺失、把一个或多个转基因引入到基因组中。在一优选的实施例中，基因变种是无效突变，例如是倒置、复制、迁移、缺失、移码（frameshift）或 RNA 接合突变的结果。在这里，“转基因”是生物技术领域常用的含义，包括通过 DNA 或 RNA 重组技术生产的或改变的且被引入到期望器官或细胞的基因序列。转基因可以包括源自器官或细胞中的基因序列，如反义序列。在一优选的实施例中，转基因包括核苷序列，该核苷序列至少有 19 连续的核苷与所述的水稻 SBEIIa 序列或 SBEIIb 的 19 个连续的核苷具有至少 94% 的同一性。典型地，转基因包括不是来自水稻的外生核酸。“转基因的”是指水稻作物或谷粒或细胞中含有转基因。“非转基因的”是指水稻作物的基因组中没有任何的转基因。为了遗传的稳定性，转基因通常被整合到器官或细胞的基因组中。

这里所述的“基因”，包括 SBEIIa、SBEIIb 或其他淀粉生物合成基因，或者对反义、增强反义、共抑制、核酶、双 RNA 之类的分子进行编码的基因，以及在其最大范围内接收的类似物，包括基因组基因，以及对应于基因的编码区（基因内区）的 mRNA 或 cRNA——如果他们存在的话，已转录但尚未翻译的序列，以及包括调节区，所述调节区包括启动子和转录终止子/多聚腺苷酸化序列。“基因”也用于描述合成的或聚合的编码部分或全部功能产品的分子。首选的基因是使用标准的重组技术从自然的 SBEIIa、SBEII 或淀粉生物合成基因中提取。通常，基因可能屈服于突变而产生一个或多个核苷替代、缺失和/或加成物。这些基因的核苷插入衍生物包括 5' 和 3' 末端聚合，以及单个或多个核苷中的序列内插入。随机的插入似乎是可行的，只要从结果产品中进行适宜地筛选；但插入核苷序列变异体是将一个或多个核苷引入到核苷序列中预定的位置。缺失变异体表征为从序列中移除一个或多个核苷。替代核苷变异体是指序列中至少一个核苷被移除和至少一个不同的核苷被插入到该位置。这种替代可以是“沉默”的，在根本上不改变由密码子所定义的氨基酸。

同样，保守替代则是指有计划地把一个氨基酸改变成另一个相似的氨基酸。典型的替代如下：

#### 氨基酸替代的适宜残留物

原始的残留物	典型的替代物
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln ; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile ; Val
Lys	Arg; Gln ; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile ; Leu

业内技术人员应该知道，细胞中基因的表达以及互补序列要求将所述基因与启动子序列可操作地链接。实现本目的的启动子的选择取决于需要的表达水平和/或该表达所在的组织、器官或细胞，优选的是胚乳特定的启动子。

把核酸分子置于启动子序列的调节控制之下，意味着放置所述核酸分子，使启动子序列能控制该核酸分子的表达。启动子通常但不是必须在上游，或

者在其所控制的核酸分子的 5'-端。更进一步地，包括启动子在内的调节单元通常位于基因转录的起始位点的 2kb 处。在异种的启动子/结构基因结合的结构中，启动子的位置离基因转录起始位点的距离，最好大致等于启动子与其所控制的基因（即，衍生该启动子的基因）之间固有的距离。根据现有技术，这个位置的启动子可以被容纳而不会引起启动子功能的损失。同样，与异种基因有关调节序列元的最佳位置定义为该调节序列元固有配置下（即，衍生该调节序列元的基因）的位置，其中，所述异种基因被放置在所述调节序列元的控制下。同样，业内公知，所述距离会有某些变化。

本发明的基因结构中，适用的启动子的实例包括，取自由病毒基因、酵母菌基因、霉菌基因、细菌基因、昆虫基因、鸟类基因、哺乳动物基因和植物基因的衍生而来的启动子，优选植物细胞中的功能性基因，特别是在水稻胚乳中表达的基因。启动子根据表达发生所在的组织的不同，而恒定地或差分地调节表达。而且，随着表达发生的发展阶段不同，或者随着物理压力、温度等外部刺激的不同，该表达也会不同。

降低 SBEIIa 或其他淀粉生物合成基因活性的方法，包括将转基因引入到可再生的水稻细胞中，或者引入到取自变性细胞的转基因水稻细胞中的步骤。支链淀粉的合成中涉及的分支酶包括 SBEI、SBEIIa、SBEIIb，而该转基因能钝化其中至少一种基因。此外，对 SBEIIb 和/或 SBEI 的钝化可是直接的，即转基因（如对双 RNA、反义、或核酶 RNA 等编码的转基因，见下述）直接针对 SBEIIb 或 SBEI 的表达，或转基因间接地导致 SBEIIb 或 SBEI 表达的减少。例如，根据序列的同一性或者碱基配对的顺序，RNA 转基因可以不但针对 SBEIIa 基因/RNA，而且还通过改变胚乳中蛋白质的稳定性或分布来降低 SBEIIb 或 SBEI 的活性。本发明的其它形式在于将减少了 SBEIIa 和 SBEIIb 活性和一种或多种其他的支链淀粉合成酶的改变相结合，所述其他的支链淀粉合成酶包括 SSI、SSII、SSIII 和脱麸酶，如异淀粉酶或普鲁兰酶。其中任何一种酶或所有酶的表达，都可以通过引入转基因来改变。在一优选的实施例中，水稻作物的 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶（ADGP）的过度表达显示出提高了产量（Smidansky et al., 2003）。



目前已经知道水稻中分支淀粉合成基因的几个 DNA 序列, 其中任何一个都可作为设计出钝化水稻基因的转基因的基础。这些序列包括水稻 cDNAs SBEIIa (基因库序列 E14723, 日本专利申请号 No. JP1998004970)、SBEIIb (D16021, Mizuno et al., 1993) 和 SBEI (D11082, Mizuno et al., 1992; D10752, Nakamura 和 Yamanouchi, 1992)。水稻的 SBEI 基因已被 Rahmant et al., (1997) 和 Rahman et al., (1999) 或基因库序列 D10838, Kawasaki et al., (1993) 所公开。更多基因序列可从下面的网址获取: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.tigr.org>; <http://www.gramene.org/about/index.html>。

小麦、大麦、玉米或其他近亲物种的 SBEIIa、SBEIIb 同族体或其他支链淀粉合成基因也能用于修改水稻中的基因表达水平。可用业内公知的方法获得所述基因或片断, 包括 PCR 放大法或杂交标记探针。同源染色体中准备用作转基因结构的区域, 应该与水稻基因具有至少 85% 的等同性, 在适当的区域, 最好是具有 85% 甚至 95~100% 的同一性。优选地, 该转基因是具体针对水稻胚乳中的支链淀粉合成基因的表达, 对作物中其他部分的支链淀粉合成只有很小的或极微弱的影响。这可以通过使用适当的调节序列, 如转基因的胚乳特定启动子来实现。

文中“严格的杂交条件”意味着, 探针和目前序列之间, 至少有 90% 最好是至少 95% 的序列同一性时, 杂交才发生。严格的杂交条件的一个例子是: 在含有下述组分的溶液中通宵培养: 50% 甲酰胺、5×SSC (1×SSC=150mM 的 NaCl 和 15mM 柠檬酸化三钠)、50mM 苯酚钠 (PH=7.6)、5×丹哈德溶液 (Denhardt's solution)、10% 硫酸化右旋糖苷和 20up/ml 变性剪切带菌 DNA, 如在鲑鱼精子 DNA, 然后在大概 65℃ 的条件下, 在 0.1×SSC 中清洗杂交支撑物。其它杂交和清洗的条件是公开的且被 Sambrook et al, 所示证, “《分子克隆: 实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, Cold Spring Harbor, NY(1989), particularly chapter 11。”

## 反义

已知的的基因工程或基因改造用于于修改特别是降低作物中基因的活



性，在业界是公知技术。引入基因变种到水稻作物中的方法包括适当的反义分子表达，该反义分子与目标基因的 RNA 互补并能与之杂交。反义分子被认为干扰了目标基因的 mRNA 的转录或处理或稳定性，从而钝化了该目标基因的表达。设计反义序列的方法在领域内是广泛知晓的。一些相关例子可以在美国专利号 5190131、欧洲专利文本 0467349-A1、欧洲专利文本 0223399-A1 和欧洲专利文本 0240208 中找到，本发明也参考结合了这些的文献。对作物采用反义技术已被 Bourque (1995) 和 Senior (1998) 所论述。Bourque 列举了很多关于如何将反义序列用在作物系统而作为基因失活的方法的例子，她同时阐述，没必要 100% 地抑制酶活性，因为部分地抑制酶活性，更可能导致作物系统发生可测定的变化。Senior (1998) 阐述，反义法是目前非常完善的用于控制基因表达的技术。

用于水稻 SBEIIa、SBEIIb、SBEI 或其他支链淀粉生物合成基因的反义分子是以水稻 mRNA 序列为基础，或以取自其他物种如大麦的与 DNA 或 mRNA 序列同族的序列为基础。这些反义序列可以对应于结构基因，或者对应于影响控制基因表达或基因剪除的序列。例如，所述反义序列可以对应于水稻 SBEIIa 或其他基因的目标编码区，或者对应于 5'-未转录区(UTR)或 3'-UTR，及其组合。所述反义序列可以与内含子序列部分互补，从而在转录时或转录后被剪除掉，优选地，仅仅剪除掉目标基因的外含子序列。考虑到 UTR 通常具有较大的趋异性，以 UTR 为目标就为基因抑制提供了较大的特异性。反义序列的长度是至少 19 个连续的核苷，优选地是至少 50 个、更优选地是至少 100、200、500 或 1000 个核苷。与整个基因转录互补的标准长度序列也会用到，其优选的长度是 100~2000 核苷。反义序列与目标转录之间的同一性程度是至少 85%，优选地是至少 95%，更优选地是至少 95~100%。反义 RNA 分子理所当然地可以包括不相关的、用以稳定该分子的序列，。

### *共抑制*

另一可用的分子生物学方法是共抑制。共抑制的机理尚未完全了解，共抑制被认为包含转录后的基因沉默 (PTGS)，从这一点看来，与很多反义抑

制的例子相似。共抑制包含以正义方向将基因或片断的额外复制引入到作物中，所述正义方向与基因表达的启动子有关。正义片段的大小、与目标基因区域的一致性、与目标基因的等同性程度，见上述反义序列。在一些实施例中，基因序列的额外复制干扰了目标作物基因的表达。实施共抑制的方法可以参考专利文本 WO 97/20936 和欧洲专利文本 0465572。

### *双链 RNA-媒介基因沉默*

将基因突变引入到水稻作物的另一种方法就是双链或双向 RNA 媒介基因沉默。该方法也涉及 PTGS。该方法中，被引入的 DNA 至少部分地指引双向 RNA 产物的合成，与将被钝化的目标基因有同源性。因此，该 DNA 包含正义和反义序列。所述正义和反义序列被转录成 RNA 时，能够杂交以形成双链 RNA 区。在优选的实施例中，正义序列和反义序列被包含内含子的间隔区域隔开，所述内含子在被转录成 RNA 时被剪除掉。这种安排能带来高效率的基因沉默 (Smith et al., 2000)。所述双链区域可以包括一个或两个 RNA 分子，该 RNA 分子由一个或两个 DNA 区域转录而来。双链分子的存在引起了内生物物系统的反应，该反应破坏双链 RNA，也破坏了从目标作物基因转录而来的同源 RNA，有效地降低或消除目标基因的活性。为实施该方法，可以参考澳大利亚专利文本 99/29514-A 和专利文本 WO 99/53050。杂交的正义和反义序列的长度至少是 19 个连续的核苷，优选地是至少 30 个或 50 个，更优选地是至少 100、200、500 或 1000 个核苷。与整个基因转录互补的标准长度序列也会用到，其优选长度是 100~2000 核苷。反义序列与目标转录之间的同一性程度是至少 85%，优选地是至少 95%，更优选地是至少 95~100%。反义 RNA 分子理所当然地可以包括不相关的、用以稳定该 RNA 分子的序列。RNA 分子可以在 RNA 聚合酶 II 启动子或者 RNA 聚合酶 III 启动子的控制下表达。后者包括 tRNA 或 snRNA 启动子。

反义、共抑制或双链 RNA 分子包括大规模双链 RNA 区域，优选地包括核定位信号 (nuclear localization signal)，如 PCT/AU03/00292 所述。在优选的实施例中，所述大规模双链 RNA 区域源于 PSTVd 类病毒，或者包括至少 35

个 CUG 三核苷酸重复(trinucleotide repeats)。

### 核酶

核酶用于引入使水稻中所期望的基因表达失活的基因变异。核酶是带有酶的或催化功能的 RNA 分子，它能够在由一个或（通常是）两个杂交序列定义的特定位置分裂其它 RNA 分子。RNA 的分裂而钝化了目标基因的表达。核酶可以扮演反义分子的角色，促成基因钝化。核酶包含在杂交序列子间的一个或多个催化域，优选锤头（hammerhead）或发夹（hairpin）类。可用的其他核酶类型包括 RNaseP、组 I 或 II 内含子以及肝炎病毒类型等。参考欧洲专利文本 0321201 和美国专利 6,221,661。用核酶来对转基因植物中基因的钝化已有示证，如 Wegener et al（1994）。

### 遗传构体/载体

本发明还提供单个的核酸分子，其中包括 RNA，最好包括对基因抑制分子进行编码的 DNA。优选地，核酸分子以水稻 SBEIIa 和/或 SBEIIb 基因序列为目标且有效地对失活水稻胚乳中 SBEIIa 和/或 SBEIIb 基因表达的反义、正义（共抑制）、双链 RNA 或核酶分子进行编码。本发明还提供一种基因结构，其包括一个或多个调节单元如启动子、增强子和转录终止或多腺苷序列。这些单元已为业内所公知。该基因结构还可以包括促进作物——尤其是单子叶作物如水稻——的转基因表达的内含子序列。此处的“内含子”是其通用含义，指已经被转录的、但没有对蛋白质进行编码的且在转换之前被剪除掉的遗传片段。如果转基因对转录产物进行编码，那么内含子可以结合到 5'-UTR 或编码区域；反之，其可以结合到任何的转录区。在一特定的实施例中，所采用的是直接的胚乳特定表达内含子，如大麦基因内含子（Ahlandsberg et al., 2002）。

本发明还提供了一种载体，如质粒载体，其中包含基因结构。此处的“载体”包括表达载体和转录载体。表达载体能够在体外表达和体内表达；转录载体能够从一个细胞或器官被转移到另一个细胞或器官中。载体包括在细胞中提供复制的序列，如原核细胞中 E 大肠杆菌或土壤杆菌。优选地，载体是

包括 T-DNA 序列的二元载体，由至少一个 T-DNA 边界序列定义。本发明还提供了一种包括载体的细胞，例如土壤杆菌或水稻细胞，所述细胞是可再生的，如幼胚盾片上的细胞。可选地，这些细胞可以是转化后含转基因的水稻细胞。

### *启动子/终止子*

本发明中的转基因或其他基因结构可包含为水稻胚乳提供调节和本质表达的转录起始区（启动子）。这些启动子可以是组织特异性的，在胚乳中具有选择性与排他性表达。这些启动子既可以是胚乳特异性的（如高分子量麦谷蛋白启动子、水稻 SSI 启动子、水稻 SBEII 启动子、水稻 GBSS 启动子）也可以是非胚乳特异性的启动子[如泛素启动子(ubiquitin promoter)或 CaMV35S 或增强 35S 启动子]。这些启动子可以被温度、光或压力等因素所调整。通常，这些启动子由被表达的 5' 基因序列提供。这样的结构还包含其他加强转录的单元，如 nos 3' 或 ocs 3' 多聚腺苷酸化区域或转录终端。所列举的 DNA 区域可以结合在含有选择性标记基因序列和其它单元的载体之中，或结合在含有这些序列的与该载体共转化的载体之中。

### *水稻的改造方法*

通过引入外生核酸的方式引入遗传变种到作物中来对水稻进行改造的方法，在本领域内是公知的。如见 Chan et al., 1993; Hiei et al., 1994; Zhang et al., 1997; Buchholz et al., 1998。如业内所知，适当的土壤杆菌族 (*Agrobacterium* strains)、或者基因枪法、或者水稻质体吸收的聚乙二醇媒介，或类似物，都作为改造的媒介。携带有所期望的核苷序列或基因结构以及可选择的标志的载体，可被引入到培养作物或外植体组织的可再生细胞中，例如，原生质体或未发育完全的胚晶或胼胝体 (callus)。所述可选择的标志基因可以为水稻细胞提供抗生素或除草剂抵抗力，或者允许使用底物，如甘露糖，用于生长。优选地，所述可选择的标志将甘氨酸、潮霉素或草铵膦 (phosphinothricin) 抵抗力引入到水稻细胞中。优选地，所述可再生的水稻细胞来自幼胚或成熟晶胚的盾片及其愈合组织，或者分生组织 (meristematic tissue)。改造后的细胞



用业内公知的方法筛选和再生以产出改造后的水稻作物，如实施例 2 所述。

改造后的作物可包含可选择的标志基因，或者包含在再生过程/再生之后被移除的基因。如从基因组中切除所述的可选择的标志基因，或从导致抑制 SBEIIa 和/SBEIIb 的转基因中分离出可选择的标志基因。

转基因或突变已被整合到染色体之中的作物可以被筛选出来，如采用恰当的对该转基因或表型的观测具有特效的核酸探针来筛选。可以采用任何一种可行的方法来确认转基因作物的存在。例如，可以用聚合酶链式反应（PCR）来放大经改造的作物特有的序列，再用凝胶电泳法或其他方法对放大产物进行探测。从作物中提取 DNA 的方法可以是传统的方法或 PCR 反应，其中，PCR 反应的实施采用了能区分改造过的和未经改造的作物的引子。例如，可以设定引子来放大 DNA 区域，该 DNA 区来自隐藏在构体中的载体并设定反引子来放大相关基因的 DNA 区域。如果该作物已经被成功改造，那么这些引子仅放大某一片段。另一个能证实进行了有效改造的替换方法是业内公知的 DNA 印迹交法（Southern blot hybridization）。可以根据显型，来区分或识别改造作物或突变作物与未改造作物或天然作物。如根据可选择的标志基因的存在所带来的显型，或免疫法的特异蛋白质的存在所带来的显型，或者某特异蛋白质不存在所带来的显型，如用 ELISA 化验法或蛋白质印迹分析（Western blot analysis）分析法检测发现胚乳中不存在 SBEIIa 蛋白质所带来的显型。可以通过观察谷粒的表形特性来筛选这样的作物，如对不缩水谷粒/升高的直链淀粉含量进行可视化的检测或测量，或者通过显微镜来检测淀粉颗粒是否存在双折射等。

### 突变

通过在相应的基因或调节序列进行适当的突变，可以实现导致胚乳中 SBEIIa 酶活性或其他淀粉生物合成酶活性降低的遗传变种的引入。基因被抑制的程度，在一定程度上决定了改造后的淀粉的特性。这些突变可以是截断，或者是无效突变，它们被认为对淀粉的本性有着显著的影响，然而，淀粉结构的改变也可由渗漏突变体（leaky mutant）引起，所述渗漏突变体显著地减

少了水稻谷粒或淀粉的支链淀粉合成酶的活性以提供所期望的特性。其它染色体重组也是有效的方法，包括缺失、插入、复制或、点突变等。

突变可以通过化学的或辐射的手段来实现，例如对种子进行 EMS 或叠氮钠（Zar and Chandler, 1995）处理，或者  $\gamma$  辐射。对于  $\gamma$  辐射诱导突变，种子在钴 60 放射源下以 20-50 kR 剂量照射（Zikiryaeva and Kasimov, 1972）。EMS 突变是把种子用 EMS（0.03%, v/v）进行处理（Mullins et al., 1999）。突变的分离可以采用筛选突变作物或种子来实现。例如，可以用 ELISA 法，从一定数量的突变的水稻中，筛选出谷粒中直链淀粉含量高的和/或大于正常的支链淀粉分布链长度的、或者不含 SBEIIa 和/或 SBEIIb 蛋白质的，或者根据已改变的谷粒形态（Green et al., 1997）来筛选。筛选最好在缺少某种 SBE 活性的谷粒形态下进行，例如 SBEIIb-或 SBEIIb-阴性背景下。然后，通过采用具有所期望的遗传本底的作物与这种突变种进行杂交，并通过适当数量的回交把不想要的母体遗传本底除掉，从而把这些突变被引入到所期望的遗传本底中。优选的突变是影响水稻的 SBEIIa 和 SBEIIb 表达或活性的突变。

因此，本发明提供高直链淀粉、非转基因的水稻谷粒及其产品。

对 SBEIIa、SBEIIb 或涉及支链淀粉合成有关的核酶编码的突变，例如 GBSS 水平的提高，使水稻胚乳的淀粉中直链淀粉含量升高。每颗谷粒中直链淀粉量的增加，是碳元素从支链淀粉转到直链淀粉的结果；如果每颗谷粒的淀粉量显著减少，直链淀粉的量也可能减少。但这两种情况下，直链淀粉占淀粉的百分比都是升高的。

据报道，高直链淀粉大麦的种子中有扭曲形状的淀粉颗粒（Morell et al., 2003），低支链淀粉（LAPS）玉米淀粉中有 90%左右的直链淀粉（Sidebottom et al., 1998）。这些显型可用于选择一定数量的诱变水稻。双折射也可用于此。双折射是物质在两个方向反射光的能力；在偏振显微镜下观察时，双折射在淀粉颗粒上产生暗十字，称为“马尔他十字”（“maltese cross”）。双折射是颗粒内聚合体的结构组织规则程度的反映（Thomas 和 Atwell, 1999）。淀粉颗粒中双折射的损失通常与增加的直链淀粉含量有关。

### 适宜的食用产品

本发明另一方面提供一种适于食用产品的水稻，其谷粒的淀粉中包含相对高的直链淀粉含量和降低了的支链淀粉含量。优选地，所述谷粒来源的水稻作物的生长期胚乳中具有降低了蛋白质和/或活性水平的 SBEIIa 和 SBEIIb。本发明的水稻作物适用于食用产品，尤其是商业食用产品。

水稻的期望遗传本底包括农业收益和其他特性。这些特性可以包括农学性能、抗病体和非生物压力抵抗性。在澳大利亚，某些人希望把改造后的淀粉特性杂交到水稻栽培变种，包括亚玛茹 (Amaroo)、艾丽康蕃 (Ali Combo)、笆斯玛蒂 (Basmati)、蕃杆 (Bogan)、蕃比芽 (Bombia)、冬嘎喇 (Doongara)、谷拉哈 (Goolarah)、伊纳帮 (Illabong)、加哈 (Jarrah)、越光米 (Koshihikari)、吉尔玛 (Kyeema)、朗节 (Langi)、米林 (Millin)、纳玛葛 (Namage)、澳派司 (Opus)、蓓耳德 (Pelde) 或其他广泛种植的变种。所列举这些品种是适宜于澳大利亚生产区的，其他的变种适宜于其他种植区。优选地，在至少一些栽培区，相对于所种植的野生水稻品种，本发明的水稻变种能带来不少于 80% 的收益，更优选地是不少于 90%，特别优选地，是不少于 95% 的收益。所述产量收益可通过试验控制田很容易地测量到。

谷粒中淀粉含量 (w/w) 至少是 25%，优选地是至少 35% 或 45%，更优选地是接近野生水平的 55% 至 65% (w/w)。更优选地，谷粒的淀粉含量至少是等同的、未经改造的水稻的谷粒淀粉含量的 90%。淀粉含量低于野生作物的，很可能是降低了支链淀粉水平的结果。即使淀粉含量更低，这种谷粒在食品生产上也还是有用的，因为高直链淀粉产品具有相对的高价值。其他期望的特性包括谷粒的碾磨能力，特别是谷粒的硬度。另一方面，是谷粒中淀粉提取程度，淀粉提取率越高，越有用，这种谷粒就越有价值。谷粒的形状也是影响作物商业有用性的一个特性，因为其对碾磨的难易程度产生影响。例如，细长形状的谷粒就难碾磨和加工。

使用标准的方法能很容易地从水稻谷粒中分离出淀粉，例如通过在碱性溶液中湿磨以去除蛋白质。碎米在碱性溶液中浸泡 24 小时后，接着在碱性溶液粉磨机、锤磨机或石磨中湿磨。米糊存放 10 至 24 小时，用筛除去纤维，



通过离心收集淀粉，然后用水清洗，干燥后就得到淀粉。

### 改性淀粉的物理特性

本发明另一方面，水稻淀粉具有改变了的糊化温度，可用采用差式扫描量热法（DSC）测量。糊化是在过量的水中淀粉颗粒的分子顺序被热驱动瓦解（分裂），具有伴随的和不可逆转的属性变化，如微粒膨胀，晶体溶解、双折射损失、粘性增加和淀粉加溶。与野生作物的淀粉相比，糊化温度升高或降低取决于残余的支链淀粉的链长。玉米中的 *ae*（amylose extender，直链淀粉补充剂）突变带来的直链淀粉含量增高，显示出玉米的胶凝温度比常态的高（Fuwa et al.,1999,Krueger et al., 1987）。换句话说，相对于控制作物，大麦的 *sex6* 突变的淀粉缺乏淀粉合成酶 IIa 活性，糊化温度变低，糊化峰点的焓减少（Morell et al.,2003）。

胶凝温度的改变，可能与直链淀粉含量高有关系。用差式扫描量热法测定出野生水稻淀粉胶凝第一峰值的温度典型的是 61-67°C（Rahman et al.,2000），该温度定义为起点温度（onset temperature）。

与野生作物的淀粉比较，可以通过在过量的热水中的膨胀率来描述本发明所涉及的淀粉的特征。膨胀体积的测量，通常是将淀粉或面粉和水混合，再加热到高温，通常是 90°C 以上。然后通过离心法取样，膨胀体积通常用样品沉淀物的质量除以样品的干重来标示。在食品加工中，特别是含水食品加工中，要增加淀粉的含量，就期望淀粉具有低膨胀率的特性。

本发明中筛选出来的水稻淀粉的结构，与普通水稻淀粉的不同之处是，结晶度比普通水稻淀粉低。淀粉结晶度的降低，被认为能加强其感官属性，口感上会觉得更滑。淀粉结晶度的降低，可能是因为一个或多个支链淀粉合成酶活性的减少。结晶度可以通过 X-射线结晶学来探测。

支链淀粉结构改变的一个尺度就是淀粉链长的分布，或者聚合度。可以先用荧光辅助糖类电泳（FACE），接着使用异淀粉酶脱麸来测定链长分布。本发明中，淀粉中的支链淀粉链长分布的范围是从 5 到 60，大于野生作物脱麸后的淀粉的链长分布范围。链长更长的淀粉，分支的频率有相应的减少。



因此，淀粉的支链淀粉中，仍然存在具有更长的支链淀粉链长的分布。

### 食用特性

淀粉是人类饮食中碳水化合物的主要来源，尤其是亚洲。本发明的谷粒及其产物都可加工成食品。这些食品可以供人或动物食用，如家畜食品或宠物食品。来自改造后的水稻作物的谷粒，能容易地用在食品加工中。因此，本发明所得的改性淀粉颗粒可用于食品加工程序，因而本发明包括碾磨的、磨碎的、粗磨的、爆裂的、碾轧的、煮的或蒸的谷粒，或由此而得的产品，包括粉、面包、礼品（brokers）、米糠和米糠油。所述产品可以是预煮的或速煮的米，速食米、粒状米、糊化米、罐装米或米饭布丁。谷粒或淀粉可用于加工各种水稻产品，包括面条、年糕、米纸或蛋卷，或者发酵食品，如发酵的面粉或者饮料，如酒。所述谷粒或淀粉也能用于面包、蛋糕、爆米花、饼干等，包括将米粉与面粉（小麦粉）或其他粉、食品添加剂如增稠剂、结合剂混合，或者用于制造饮料、面、意大利面食或速食汤等。这些米制食品也适用于无麦食物。本发明的谷粒衍生的米或产品，如爆米花、米薄片等是特别受欢迎的早餐食品。本发明的直链淀粉含量高的淀粉，可以用做强力凝胶剂，这在制糖产品中很有用，节省了成型和固化时间；还可以用来做食物敷层，如应用到油炸马铃薯上，可以减少对油的吸收。

### 食用纤维

在本文本中所述的食用纤维，是指碳水化合物和碳水化合物消化产物。这些消化产物不会被健康人体的小肠吸收，而是进入到大肠中。食用纤维包括抗性淀粉和其他可溶的或不可溶的碳水化合物聚合体，还包括部分的碳水化合物蛋白，这种蛋白是可发酵的，至少能够被大肠的常驻微生物群部分地发酵。

本发明所述的淀粉优选地包括相对高含量的食用纤维，特别是相对高含量的直链淀粉。本发明中的谷粒中食用纤维的含量，可以是胚乳中直链淀粉含量增加单方面造成的；也可以是多方面造成的。

本发明的其他方面涉及高蛋白淀粉层、微生物、高含量的食用纤维的结

合。具体地，涉及谷粒中更高的相对的蛋白淀粉/微生物高含量。轻度缩水的水稻谷粒中，胚乳的量也减少，而高蛋白淀粉层和微生物含量却相对地提高了。这种水稻具有相对高含量的特定有益的元素或者维生素、抗性淀粉等，包括二价阳离子、可生物利用的  $\text{Ca}^{++}$  和维生素如叶酸、抗氧化剂如维生素 E 和生育三烯酚类等。碾磨产物的一种形式是包括高蛋白淀粉层。特定的碾磨处理可以提高碾磨产品中糊份层的含量。因而由碾磨谷粒衍生的或其他处理所衍生来的任何食品都具有高蛋白淀粉层和微生物含量，具有附加的营养成分，而不需要从其他来源添加相应的元素。

### 抗性淀粉

抗性淀粉，是一个总称，指没有被健康人体的小肠吸收而进入大肠的淀粉及淀粉产品。因此，抗性淀粉不包括被小肠吸收消化的淀粉，抗性淀粉包括不能被身体吸收的淀粉（RS1 型），抗性原淀粉颗粒（RS2 型），回生淀粉（retrograded starch, RS3），化学变性淀粉（RS4）。本发明中改变淀粉的组成特别是提高直链淀粉的含量，会引起食物中抗性淀粉的增加。增加的抗性淀粉可能是 RS1 型的，基本上不会被消化。经 V-complex 结晶度测量的淀粉-脂肪的结合度，也对抗性淀粉含量升高产生影响。

可以理解，本发明的一个好处就是其能产生具有特定营养价值的食品，并且，不需要对水稻谷粒的淀粉或其他的成分作收割后的改性。但是，有时可能期望对谷粒的淀粉或其他的成分进行改性，本发明就包含这种改性要素。改性方法是公知的，包括用传统的方法提取淀粉或其他成分，以及改良淀粉以增加抗性形式的淀粉。可使用热/湿度、物理加工（如碾磨）、酶促（如用  $\alpha$ -直链淀粉或  $\beta$ -直链淀粉酶，普鲁兰酶等）、化学水解（采用液态或气态试剂进行湿式或干式水解）、氧化、双官能剂交联（如三偏磷酸钠、三氯氧磷等）、羧甲基化等处理方法来对淀粉进行改性。

### 糖解指数

糖解指数（GI）涉及含淀粉食物的消化率，是用来比较试验食物与白面包或葡萄糖所带来的血液中葡萄糖浓度效果的。糖解指数根据膳食后血糖浓

度，以及要维持血液中葡萄糖的动态平衡所需要胰岛素量来衡量该食物可能存在的效用。本发明涉及的食物，一个重要的特性就是降低了糖解指数。志愿者摄取高直链淀粉水稻 30 分钟后，血糖水平比摄食等同低直链淀粉水稻的要低（Goddard et al., 1984）。更进一步地，该食物最终消化水平低，是相对低能量的食物。低能量产品包括含有面粉的糙米颗粒。这些产物有利于补充、增强肠胃的健康，有利于减少膳食后血糖浓度和油脂浓度，同时也能提供低热量的食品。

### *非食用的应用*

本发明提供一种改造过的或改良的淀粉，其具有提高了的直链淀粉含量或降低了的支链淀粉含量，这些特性满足工业上的很多要求。淀粉广泛用于非食用工业，包括薄膜、纸张、纺织品、瓦楞纸、粘合剂产业（Young 1984），如用作浆料。水稻淀粉可以当作生产葡萄糖浆产品或乙醇产品的原料。未经改性的淀粉，其物理特性限制了其在某些方面的使用，经常需要对其进行化学改造，这种化学改造通常成本很高或者有其他方面的缺陷。本发明提供的淀粉，收割后不需要对其做太多的改造，其支链淀粉含量已经被减少，还附着其他物理特性。如，糊化温度、抗剪应力（shearing stresses）、成膜强度和/或淀粉的抗水性，由本发明的谷粒制造的产品性能也可以被改变。本发明所涉及的淀粉还可以用来加工可生物降解的宽松包装材料，可以作为聚苯乙烯或者其他包装材料的替代品。

本上面已经对本发明的多个方面进行了说明，可以理解地，本发明也可以包含于上述两个或多个方面的组合。

## **实施例**

### 实施例 1：材料与方法

#### *材料与溶液*

#### 宏量元素（macro-elements）N6(20×原液)

g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.3
$\text{KNO}_3$	56.6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3

宏量元素 MS (20×原液)

	g/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	33.0
$\text{KNO}_3$	38.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8

微量元素 N6 (1000×原液)

	mg/100 ml
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	150
$\text{H}_3\text{BO}_3$	160
KI	80

微量元素 MS (1000×原液)

	mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22300
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6220
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8600
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25



CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25
KI	830

微量元素 B5 (100×原液)

	mg/l
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1000
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3.87
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.5
KI	75

维生素 N6 (100×原液)

	mg/100 ml
甘氨酸 (Glycine)	20
盐酸硫胺 (Thiamine-HCl)	10
盐酸吡哆醇 (Pyridoxine-HCl)	5
烟酸 (Nicotinic acid)	5

维生素 MS (100×原液)

	mg/100 ml
肌醇 (myo-Inositol)	1000
盐酸硫胺 (Thiamine-HCl)	1
盐酸吡哆醇 (Pyridoxine-HCl)	5
烟酸 (Nicotinic acid)	5

维生素 B5 (100×原液)

	mg/100 ml
甘氨酸 (Glycine)	1000
盐酸硫胺 (Thiamine-HCl)	100
盐酸吡哆醇 (Pyridoxine-HCl)	10
烟酸 (Nicotinic acid)	10

铁 MS (MS iron) (200×原液)

	ml/500 ml
FeCl <sub>3</sub> (60% w/v)	2.7

乙二胺四乙酸二钠 MS (MS Na<sub>2</sub>.EDTA) (200×原液)

	g/500 ml
乙二胺四乙酸二钠 (Na <sub>2</sub> .EDTA)	3.7

制备 2,4 二氯苯氧乙酸 (2,4-D) (1mg/ml, Sigma No. D-6679) 原液: 将 100mg 的 2,4-D 溶解在 1ml 无水乙醇中, 并在其中加入 3ml 1N 的 KOH, 再用 1N 的 HCL 将 pH 调为 6。

制备 6-苄氨基嘌呤 (6-benzyl amino purine, BAP) (1mg/ml BAP, Sigma No. B-3408) 溶液和萘乙酸 (naphthalene acetic acid, NAA) (1mg/ml NAA, Sigma No.N-0640) 溶液。

制备脱落酸 (Absciscic acid, ABA): 将 250mg ABA 溶解在 2ml 的 1M NaOH 中, 用无菌注射用水 (sterile water) 将其稀释到 100ml。

制备特美汀 (Timentin) (150mg/ml, Smith-Kline Beecham 6571-30): 将 3.1g 特美汀溶解在 20.66ml 的无菌注射用水中。

从罗氏 (Roche) 公司 (No. 843 555) 或者 Sigma 的其他试剂中提取潮霉素 (50mg/ml)。

愈伤组织诱导溶液 N6D (N6D media for callus induction)

	(总量/升) amount/litre
宏量 N6 (N6 macro) (20×)	50 ml
微量 N6 (N6 micro) (1000×)	1 ml
维生素 N6 (N6 vitamins) (100×)	10 ml
铁 MS (MS iron) (200×)	s5 ml
乙二胺四乙酸二钠 MS (MS Na <sub>2</sub> .EDTA) (200×)	5 ml
肌醇 (Myoinositol)	100 mg
酸水解酪素 (Casamino acid)	300 mg
脯氨酸 (proline)	2.9 g
2,4-D (1mg/ml)	2 ml
蔗糖 (Sucrose)	30 g

用 1M 的 KOH 将 pH 调至 5.8，每升溶液添加 3g 有机抗敏 (phytogel)，混合后高压灭菌。

接种溶液 (media for subculturing) NB

	总量/升 (amount/liter)
宏量元素 N6 (20×)	50 ml
微量元素 B5 (100×)	10 ml
维生素 B5 (100×)	10 ml
铁 MS (200×)	5 ml
乙二胺四乙酸二钠 MS (200×)	5 ml
2,4-D (1mg/ml)	2 ml
蔗糖 (Sucrose)	30 g
脯氨酸 (proline)	500 mg
谷酰胺 (Glutamine)	500 mg
酶水解酪素 (Casein enzymatic hydrolysate, CEH)	300 mg

用 1M 的 KOH 将 pH 调至 5.8-5.85，每升溶液添加 3g 有机抗敏(phytogel)，混合后高压灭菌。

接种溶液 MS

	总量/升 (amount/liter)
宏量元素 MS (20×)	25 ml
微量元素 MS (1000×)	1 ml
维生素 MS (100×)	10 ml
铁 MS (200×)	5 ml
乙二胺四乙酸二钠 MS(200×)	5 ml
蔗糖	10 g

用 1M 的 KOH 将其 pH 调至 5.8-5.85，每升溶液添加 2.5g 有机抗敏 (phytoigel)，混合后高压灭菌。

NBO: NB 溶液在调节 pH 值之前，加入 30g/l 的甘露醇 (mannitol) 和 30g/l 的山梨糖醇 (sorbitol)。

NBHT30: NB 溶液在高压灭菌之后且倾倒之前，加入 30g/l 的潮霉素 (hygromycin) 和 150g/l 的特美汀 (Timentin)。

NBHT50: NB 溶液在高压灭菌之后且倾倒之前，加入 50g/l 的潮霉素 (hygromycin) 和 150g/l 的特美汀 (Timentin)。

PRHT50: NB 溶液 (不含 2,4-D) 在高压灭菌后加入以下物质，使其最终成分如下: BAP (2 mg/l)，NAA (1 mg/l)，ABA (5 mg/l)，潮霉素(50 mg/l) 和 特美汀(150 mg/l)。

MST 溶液: MS 溶液在高压灭菌后，添加 NAA 和特美汀，使该媒介 MS 的 NAA 和特美汀分别为 0.05 mg/l 和 150 mg/l。



### 水稻改造

将成熟谷粒脱壳，在 70%的乙醇中浸泡 1 分钟，然后用消毒水清洗 3 次，接着在 50%的漂白剂中浸泡 30 分钟。在无菌条件下将灭菌后的谷粒用消毒水彻底清洗，接着在 N6D 溶液中培养。培养板用微孔膜密封，在光照下孵化 6-8 周，孵化温度为 26-28℃，以产生愈伤组织（callus）。不用对谷粒的晶胚作任何解剖，从晶胚的角质鳞片（scutellum）即可推测愈伤组织的生成。需要接种时，将愈伤组织（calli）转移得到 NB 溶液中，用封口膜密封培养板，置于铝箔覆盖的暗箱中，温度 28℃。每 4 周实施一次接种。在将愈伤组织用于改造前，接种次数不多于 5 次。

对于土壤杆菌属为媒介的改造，将含有要被转移的基因结构的土壤杆菌族在 28℃下、在具有适当抗生素的培养板上生长。生长两天后，从培养板上刮下土壤杆菌族细胞，将其重新悬浮在含 100um 乙酰丁香酮液体的 NB 溶液中。10 分钟后，看起来健康的愈伤组织会浸入在悬浮液中。将健康的愈伤组织排出，将其置于含有 100um 乙酰丁香酮的 NBO 培养板上，在 25℃的阴暗处放置 2 天。这个阶段称为含有基因结构的土壤杆菌族的“协同培养”。协同培养之后，用含 150ml/l 特美汀的消毒水冲洗愈伤组织，简单晒干后在含有 150mg/l 特美汀的 NBHT30（其包括选择性的潮霉素试剂）中培养。在 26-28℃下，3-4 周后，将生长区的愈伤组织在相同的溶液中再培养 10-24 天。再培养表明愈伤组织中具有了抗潮霉素，即变性的愈伤组织。将这些愈伤组织转移到含特美汀的 NBHT50 培养板上，再在 26-28℃的阴暗处孵化 14-21 天。将看起来健康的愈伤组织转移到 PRHT50 排样板上，置于阴暗处 8-12 天。最后，在 28℃的 RHT50 溶液中培养 30 天或更长时间，即长出新芽（shoot）。将具有根系的芽转移到 1/2MST 溶液中，当芽长到一定程度后，再将其转移到温室的土壤中。该方法已在多种水稻品种上试验成功，包括籼稻（indica）和粳稻（japonica）。

### 实施例 2：基因减量调节的构造准备

用 PCR 放大水稻的 SBEI、SBEIIa 和 SBEIIb 基因片断，以用于水稻基因表达的减量调节的基因构造准备。所述基因片断从靠近基因 3'末端的外显子区选取，因为该区域具有更多的分支，该区域被认为是能通过变性水稻的构造来降低可能的基因交叉沉默。被放大的片断是：基因库序列为 D11082 的 SBEI-核苷的 1982-2527 片断；；基因库序列为 AB023498 的 SBEIIa-核苷的 2458-2997 片断；基因库序列为 D16201 的 SBEIIb-核苷的 2414 至 2912 片断(其序列分别在图 1-3 中示出)。放大后的片断被克隆到质体载体 pGEM®-T 中所述放大后的片断包括附加的序列，其末端包括核酸内切酶限制点 (restriction endonuclease sites) 以利于该克隆步骤。同时通过放大水稻 SBEI 内含子 9 的序列而获取内含子的序列。该片断包括基因库序列为 D10838 的遗传序列的核苷 9112-9606 片断序列，然后在 *SpeI* 和 *EcoRI* 限制点侧接，再将片断插入到 pBCSK<sup>-</sup> (stratagene 公司) 以形成 pRint9\_BC (图 4)。接着，在 pRint9\_BC 中，以反义和正义方向分别在 *SpeI/XbaI* 和 *XhoI/EcoRI* 点克隆 SBEI、SBEII 和 SBEIIb 基因的外显子片断。这就得到了每个序列的反向重复，且各自被内含子序列所分隔。所得到的质体被称为 pRBEI.IR、pRBEIIa.IR 和 pRBEIIb.IR (图 5)。采用 *BamHI* 和 *KpnI* 可切掉嵌合片断 (chimeric fragments)，将所切掉的嵌合片断插入到 pBx17casNOT 的相同位置 (图 6)。这样，Bx17 启动子区和 nos3'末端区的以正确的方向 (correct orientation) 连接了反义/内含子/正义嵌合片断。接着使用 *HindIII* 和 *NotI* 消化切掉每个表达盒 (expression cassette)，将被切掉的表达盒插入到二元载体 WBvec8 (Wang et al., Acta Hort 461:401-407, 1998)，该二元载体 WBvec8 包含作物可表达的潮霉素基因和奇霉素基因，其中，潮霉素用于选择作物细胞，记霉素用于选择细菌。这些结构称为 dsSBEI、dsSBEIIa、dsSBEIIb。接着，通过电穿孔法 (electroporation) 将这些结构转移到根癌土壤杆菌族 (*Agrobacterium tumefaciens*) (AGL1) 细胞之中 (Lazo et al., (1991))。

采用小麦中对应的 SBEIIa 基因，另一种双 RNA (dsRNA) 构造导致降低水稻中 SBEIIa 基因也可能是 SBEIIb 基因的表达。对于上面的其他构造，在正义和反义方向对应于部分 SBEIIa 基因的所期望的核酸序列与启动子有关，

这样被表达的 RNA 中包含能碱基配对形成双链 RNA 的互补区。当在转基因植物内转录部分 RNA 时，在正义和反义序列之间的隔离区域包含的基因内区序列就会被剪除而形成紧密的“发夹式的”双重结构。基因内区的内含物被发现由于双 RNA 结构的关系而能增加基因沉默(gene silencing)的效率(Smith et al, 2000)。所期望的核酸与高分子量的麦谷蛋白(HMWG)启动子序列(Dx5 亚基因启动子，编号 Accession No. X12928, Anderson et al., 1989)和来自农杆菌(Agrobacterium, nos3')胭脂氨酸合酶基因的终止序列相连接。这就造成了双链 RNA 胚乳的特定表现。

SBEIIa 双链 RNA 结构包含来自小麦 SBEIIa 基因被 PCR 放大的 1536bp 核苷酸序列(基因库序列 AF338431)。其中包括：含有整个外显子 1 和 2 以及部分外显子 3，在两旁具有 *EcoRI* 和 *KpnI* 限制位的 468bp 序列(片断 1)；由部分外显子 3 和 4 以及 SBEIIa 的整个基因内区 3 组成的两旁具有 *KpnI* 和 *SacI* 位的 512bp 片断(片断 2)；以及由 SBEIIa 的整个外显子 1、2 和 3 组成的在两旁具有 *BamHI* 和 *SacI* 位 SBEIIa 的 528bp 片断(片断 3)。所使用的序列与水稻 SBEIIa 基因(SBE4)有超过 217 个核苷具有 80%的同一性，在更短的区域上有更高的同源性(50 个核苷为 87%；27 个核苷为 92%)，因此可以预测到，这些基因在水稻中的表达将显著降低水稻 SBEIIa 的表达。小麦序列与水稻分子酶-3 有超过 113 个核苷上有 76%的同一性，因此，认为等同的 SBEIIa 也会影响该转录水平。

接着，将片断 1、2 和 3 捆绑在一起，其中片断 3 和片断 2 相对于片断 1 的反义方向捆绑。双链 RNA 结构最初产生于包含有 HMWG 启动子序列和 nos3'终止子的载体 pBx17casNOT(图 6)。载体中 pBx17casNOT 的基因结构称为 pBx17ds-wSBEIIa，而双链 RNA 结构称为 ds-wSBEIIa。包含 ds-wSBEIIa 基因的 cassette 被插入到 pWBvec8 中，然后被引入到农杆菌(Agrobacterium)属 AGLL1 中，并用于如实施例 1 所述的水稻改造。

### 实施例 3：生产具有降低了 SBE 活性的水稻

根据实施例 1 所述的方法，AGL1 细胞中的结构 dsSBEI、dsSBEIIa、



dsSBEIIb 和 ds-sWBEIIa 用于产生改性水稻作物（粳稻亚种，cv.Nipponbare）。每个结构、选择的改性愈伤组织以及再生的水稻植株会用到 500 个水稻愈伤组织。植株被转移到土壤中后，使用对 SBEI、SBEIIa 或 SBEIIb 基因片断特效的引物或探针，用 PCR 或 DNA 印迹交分析法显示该植株的改性。在具有 ds-wSBEIIa 的变性中，每 23 个再生的植株中有 21 个对引入的 SBEIIa 序列呈阳性。

在丙烯酰胺凝胶体中进行胚乳蛋白质的电泳后，用蛋白质印迹分析法采用与相应蛋白质的特定抗体化验改性植株的谷粒（T1 种子）的 SBE 蛋白质。改性品种中，大部分品种 SBE 活性已降低。对谷粒的淀粉中直链淀粉含量进行测定，一些 SBEIIa 改性品种的相对直链淀粉水平是至少 40%，一部分是至少 50%。当 SBEIIa 和 SBEIIb 的活性都减少时，直链淀粉的百分比更高。

#### 实施例 4：淀粉和蛋白质分析

##### 碳水化合物测定和分析

使用 Takeda et al., (1986)、Lumdubwong et al., (2000)、Chiou et al (2002) 或 Sculman et al., (1991)的方法从生长期的胚乳或成熟的谷粒中分离淀粉。用 Megazyme (Bray, Co Wicklow, Republic of Ireland) 提供的总淀粉分析工具测定淀粉含量。接着，将该淀粉含量与控制作物的淀粉含量作比较。谷粒总重减去淀粉总重，得到谷粒中非淀粉部分的总重，以确定所减少的总重是否是由于淀粉成分的减少。

淀粉中直链淀粉成分的确定是采用如下经稍微修订的 Morrison and Laignelet (1983) 比色（碘滴定）法。准确称取大约 2 毫克（精准至 0.1 毫克）淀粉加入带橡胶垫圈盖子的 2 毫升螺帽试管中；为去除油脂，在淀粉中加入 1 毫升 85% (v/v) 的甲醇并将试管放入 65°C 水浴中加热 1 小时，偶尔搅动水体；在 13,000g 下离心过滤 5 分钟之后小心除去表面浮物，再重复进行萃取步骤。将淀粉在 65°C 下干燥 1 小时再溶入尿素-二甲基亚砷溶液中（UDMSO; 9 份二甲基亚砷与 1 份 6M 的尿素），每 2 毫克淀粉（上面称取的）加 1 毫升 UDMSO；将混合物立即充分搅动并置于 95°C 水浴中加热 1 小时，



间歇搅动水体直至淀粉完全溶解。取部分淀粉-UDMSO 溶液（50 微升）用 20 微升碘-碘化钾（I<sub>2</sub>-KI）试剂处理，碘-碘化钾试剂是由将 2 毫克碘与 20 毫克碘化钾溶解在 1 毫升水中制得的；将混合物加水至 1 毫升，取 200 微升，采用 Emax 精密酶标测定仪（美国分子仪器公司，Molecular Devices, USA）在 650nm 光波下测定混合物的吸光率。含有 0~100% 直链淀粉和 100~0% 支链淀粉的标准样品是将马铃薯直链淀粉和玉米（或马铃薯）支链淀粉（Sigma）进行处理而制成测试样品的。直链淀粉含量（直链淀粉百分率）是通过测定吸光率值再通过标准样品的回归方程式计算而得。不脱麸淀粉中直链淀粉/支链淀粉的比率同样可按照 Case et al., (1998) 提供的方法或 Batey and Curtin (1996) 提供的分离脱麸淀粉的 HPLC 法测定。

淀粉的链长分布可在将淀粉样品脱麸之后，通过 Morell et al (1998) 的荧光辅助碳水化合物电泳方法（FACE）的毛细电泳仪来测定。淀粉的凝胶温度曲线图可通过 Pyris 1 微分扫描热量计来测定（Perkin Elmer, Norwalk CT, USA）。淀粉溶液的粘度可通过快速粘度测定仪来测量（RVA, Newport Scientific Pty Ltd, Waiwera, Sydney），例如采用 Batey et al., 1997 所报道的条件，测量的参数包括峰值粘度（最高热粘度）、上止强力、终值粘度以及糊化温度。面粉或淀粉的溶胀比可通过 Konik-Rose et al (2001) 方法来确定。吸水力的确定是通过称量样品面粉或淀粉在一定温度下混入水之前后的重量变化以及所聚集的胶状物来完成的。

$\beta$ -葡萄糖水平可采用 Megazyme (Bray, Co Wicklow, Republic of Ireland) 所提供的组件来确定。

### 胚乳中蛋白质表现的分析

胚乳中特定蛋白质表现的分析是采用蛋白质印迹程序（Western blot procedures）。从母体组织中切下胚乳并将 0.2 毫克的样品在 600 微升的 50mM 的 Kpi 缓冲液中均匀成粒（42mM 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 8mM 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>），该缓冲溶液的 pH 值为 7.5，含有 5mM 的 EDTA，20% 的丙三醇、5mM 的 DTT 以及 1mM 的蛋白酵素抑制剂。研磨样品在 13,000g 下离心分离 10 分钟并将表面漂浮物在使用前于 -80°C 下冷冻。对于总蛋白质的估算，用 0, 20, 40, 60, 80

及 100 微升的 0.25 毫克每毫升的牛血清清蛋白 (BSA) 标准建立牛血清清蛋白标准曲线, 取 3 微升样品用蒸馏水稀释至 100 微升并向每一样品中加入 1 毫升蛋白质试剂 (Coomassie Plus Protein reagent), 5 分钟后在 595nm 处录得吸光率。在标准曲线上把含 0 微升 BSA 的样品, 即不含 BSA 的样品的吸光率设为空白值, 这样就测量出了样品的蛋白质水平。在含有 20 微克取自胚乳的蛋白总量的样品中加入 8% 的含有 0.34M 的三 (羟甲基) 氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl, pH 8.8) 的非改性聚丙烯酰胺胶体、丙稀酰胺 (8.0%)、过二硫酸铵 (ammonium persulphate) (0.06%) 以及 TEMED (0.1%)。在电泳作用下, 蛋白质以 Morell et al., (1997) 所述的方式被转移到硝化纤维膜上并与 SBEIIa 或 SBEIIb 种类抗体发生免疫反应。

#### **实施例 5: 通过鉴定水稻基因组的独特序列来优化目标基因的基因沉默**

将基因序列用于减少目标基因的表达 (基因沉默), 如通过双链 RNA、反义或共抑制结构等方法, 是优选的对目标基因有特效的方法。就是说, 沉默分子的核苷序列中, 至少有 19 个连续的核苷与目标基因的至少 19 个连续的核苷具有至少 95 左右的同一性。理想地, 最大的特异性是所述沉默分子 (targeted sequence) 对目标序列是唯一的, 不是植株基因组的遗传基因。这样就能最小化“基因偏移效应” (off-gene effects)。我们使用了几乎所有的水稻基因组序列的知识来比较 SBE 目标基因序列与水稻基因组剩下的基因序列, 以在这些目标基因序列中鉴定出最优的目标序列。

可从 TIGR 网站 (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>) 以 FASTA 格式下载水稻基因组 DNA 序列数据库 (OSA1.seq)。用“formatdb”格式化数据库, 使之对 BLAST 可用; 使用“dbifasta”使之可用 EMBOSS 函数。以 FASTA 格式创建查询序列, 通过运行基于基因沉默程序的 BLAST(P. Waterhouse et al, CSIRO Plant Industry, personal communication)以及一组预设的参数 (比较的选项: 词 18 和严格度 19) 来使用该查询序列搜索水稻基因组的同源序列。

如实施例 2 所述, 用于基因沉默结构的 SBEIIa、SBEIIb 和 SBEI 序列用作反水稻基因组的查询序列。其输出如图 8 所示。输出多个“NNNN...”表示该

区域内与水稻基因组至少 19 个连续核苷同源。可以看到，所使用的 SBEIIa 序列是唯一的；所使用的 SBEIIb 序列包括一些非唯一序列；而所使用的 SBEI 序列看起来像是在水稻基因组中复制的，处理末端 57 个核苷之外，该 57 个核苷被去掉了（图 8）。对当前的水稻基因序列检查发现在包括 SBEI 基因区的两个重叠 BAC 克隆体之间，有重叠的遗传 DNA 序列。这些貌似 SBEI 序列的复制可能是真实的或表征在这一区域的水稻基因组的聚集中发生的错误。

## 参考文献

- Abel *et al.*, (1996). *The Plant Journal* **10**, 981-991.
- Ahlandsberg *et al.*, (2002). *Plant Cell Rep* **20**, 864-868.
- Anderson *et al.*, (1989). *Nucl Acids Res* **17**, 461-462.
- Baba *et al.*, (1991). *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 87-94.
- Baga *et al.*, (2000). *Plant Physiol.* **124**, 253-263.
- Batey and Curtin. (1996). *Starch* **48**, 338-344.
- Batey *et al.*, (1997). *Cereal Chemistry* **74**, 497-501.
- Blauth *et al.*, (2001). *Plant Physiology* **125**, 1396-1405.
- Bourque. (1995). *Plant Science* **105**, 125-149.
- Boyer and Preiss, (1978). *Carbohydrate Research* **61**, 321-334.
- Boyer and Preiss, (1981). *Plant Physiology* **67**, 1141-1145.
- Boyer *et al.*, (1980). *Starch* **32**, 217-222.
- Buchholz *et al.*, (1998). *Methods Mol Biol* **81**, 383-396.
- Buleon *et al.*, (1998). *International Journal of Biological Macromolecules* **23**, 85-112.
- Cao *et al.*, (2000). *Archives. of Biochemistry and Biophysics.* **373**, 135-146.
- Case *et al.*, (1998). *Journal of Cereal Science* **27**, 301-314.
- Chan *et al.*, (1993). *Plant Mol Biol* **22**, 491-506.
- Chiou *et al.*, (2002). *Starch* **54**, 415-420.
- Craig *et al.*, (1998). *Plant Cell* **10**, 413-426.
- Denyer *et al.*, (1996). *Plant Physiology* **112**, 779-785.
- Ferguson. 1994. pp 55-77 in "Speciality Corns" eds , CRC Press Inc.
- Filpse *et al.*, (1996). *Planta* **198**, 340.
- Fisher *et al.*, (1993). *Plant Physiol* **102**:1045-1046.
- Fisher *et al.*, (1996). *Plant Physiol* **110**: 611-619.
- Frances *et al.*, (1998). *Plant Mol Biol* **38**, 407-415.
- Fujita *et al.*, (2003). *Plant Cell Physiol* **44**, 607-618.
- Fuwa *et al.*, (1999). *Starch/Starke.* **51**, 147-151.
- Gao *et al.*, (1996) *Plant Mol Biol* **30**, 1223-1232.
- Gao *et al.*, (1997). *Plant Physiol* **114**: 69-78.



- Gao *et al.*, (1998). *Plant Cell* **10**, 399-412.
- Giroux and Hannah. (1994). *Molecular and General Genetics* **243**, 400-408.
- Goddard *et al.*, (1984) *Am J Clin Nutr* **39**, 388-392.
- Green *et al.*, (1997). *Plant Physiology* **114**, 203-212.
- Hedman and Boyer, (1982). *Biochemical Genetics* **20**, 483-492.
- Hiei *et al.*, (1994). *Plant J* **6**, 271-282.
- Hirano *et al.*, (1998). *Mol Biol Evol* **15**, 978-987.
- Hirano and Sano, (2000). *Genes Genet Syst* **75**, 245-249.
- Isshiki *et al.*, (1998). *Plant J* **15**, 133-138.
- James *et al.*, (1995). *Plant Cell* **7**, 417-429.
- Jobling *et al.*, (1999). *Plant Journal* **18**, 163-171.
- Juliano, B.O. (1979). in Proceedings, Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality, p. 69-90. Los Baños, Laguna, the Philippines, IRRI.
- Juliano, B.O., (1985). Rice: chemistry and technology, 2nd ed. St Paul, MN, USA, Am. Assoc. Cereal Chem. 774 pp.
- Kawasaki *et al.*, (1993). *Mol Gen Genet* **237**, 10-16.
- Konik-Rose *et al* (2001) *Starch* **53**, 14-20.
- Krueger *et al.*, (1987). *Cereal Chemistry* **64**, 187-190.
- Kubo *et al.*, (1999). *Plant physiology*. **121**, 399-409.
- Lazo *et al.*, (1991). *Bio/Technology* **9**, 963-967.
- Li *et al.*, (1999a). *Plant physiology*. **120**, 1147-1155.
- Li *et al.*, (1999b). *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 1208-1216.
- Li *et al.*, (2000). *Plant Physiology* **123**, 613-624.
- Li *et al.*, (2003). *Funct Integr Genomics* **3**:76-85.
- Lumdubwong *et al.*, (2000). *J Cereal Sci* **31**, 63-74.
- Maniatis *et al.*, (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press New York.
- McCreery and Helentjaris (1994). Methods in Molecular Biology, Vol. 28: Protocols for nucleic acid analysis by non-radioactive probes, 67-71, Humana Press Inc., Totawa, NJ.
- Mizuno *et al.*, (1993). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 19084-19091.

- Mizuno *et al.*, (1992). *Journal of Biochemistry* **112**, 643-651.
- Mizuno *et al.*, (2001). *Plant Cell Physiol* **42**, 349-357.
- Morell *et al.*, (1997). *Plant Physiology* **113**, 201-208.
- Morell *et al.*, (1998). *Electrophoresis* **19**, 2603-2611.
- Morell *et al.*, (2003). *Plant J.* **34**: 173-185.
- Morrison and Laignelet (1983). *Journal of Cereal Science* **1**:9-20.
- Mullins *et al.*, (1999). *European Journal of Plant Pathology* **105**: 465-475.
- Myers *et al.*, (2000). *Plant Physiology* **122**, 989-997.
- Nakamura (2002). *Plant Cell Physiology* **43**, 718-725.
- Nakamura and Yamanouchi (1992). *Plant Physiol* **99**: 1265-1266.
- Nair *et al.*, (1997). *Plant Sci* **122**: 153-163.
- Nishi *et al.*, (2001). *Plant Physiology* **127**, 459-472.
- Rahman *et al.*, (1995). *Australian Journal of Plant Physiology* **22**, 793-803.
- Rahman *et al.*, (1997). *Genome* **40**: 465-474.
- Rahman *et al.*, (1999). *Theor Appl Genet.* **98**: 156-163.
- Rahman *et al.*, (2000). *J Cereal Sci* **31**: 91-110.
- Rahman *et al.*, (2001). *Plant Physiol* **125**: 1314-1324.
- Repellin *et al.*, (1997). *Plant Gene Reg* **97**-094
- Safford *et al.*, (1998). *Carbohydrate Polymers* **35**, 155-168.
- Schulman and Kammiovirta, (1991). *Starch* **43**, 387-389.
- Schwall *et al.*, (2000). *Nature Biotechnology* **18**, 551-554.
- Senior (1998). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **15**, 79-119.
- Shannon and Garwood, (1984). In *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler *et al.*, eds, Academic Press, Orlando, FL, pp25-86.
- Shure *et al.*, (1983). *Cell* **35**, 225-233.
- Sidebottom *et al.*, (1998). *Journal of Cereal Science* **27**, 279-287.
- Smidansky *et al.*, 2003) *Planta* **216**, 656-664.
- Smith *et al.*, (2000) *Nature* **407**, 319-320.
- Sun *et al.*, (1996). *Physiol Plantarum* **96**, 474-483.
- Sun *et al.*, (1997). *The New Phytologist* **137**, 215-215.

- Sun *et al.*, (1998). *Plant Physiol* **118**, 37-49.
- Takeda *et al.*, (1986). *Carbohydr Res* **148**, 299-308.
- Takeda *et al.*, (1987). *Carbohydr Res* **168**, 79-88.
- Takeda *et al.*, (1993a). *Carbohydrate Research* **240**, 253-262.
- Takeda *et al.*, (1993b). *Carbohydrate Research* **246**, 273-281.
- Terada *et al.*, (2000). *Plant Cell Physiol* **41**, 881-888.
- Thomas and Atwell 1999 Starches Eagen Press, St Paul, Minnesota, USA pp: 13-24.
- Thorbjornsen *et al.*, (1996). *Plant Journal* **10**, 243-250.
- Wang *et al.*, (1990). *Nucl Acids Res* **18**, 5898.
- Wang *et al.*, (1998a). *Journal of Experimental Botany* **49**, 481-502.
- Wang *et al.*, (1998b). *Acta Hort* **461**, 401-407.
- Wegener *et al.*, 1994. *Mol. Gen Genet.* **245**, 465-470.
- Yamamori *et al.*, (2000). *Theor.Appl.Genet.* **101**, 21-29
- Yamanouchi and Nakamura (1992). *Plant Cell Physiol* **33**, 985-991.
- Young. (1984). in Whistler *et al.* (eds), Academic Press, Orlando, FL, chap 8.
- Zhang *et al.*, (1997). *Mol Biotechnol* **8**, 223-231.
- Zikiryaeva and Kasimov, (1972). *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal* **6**, 18-20.
- Zwar and Chandler, (1995). *Planta* **197**, 39-48.

&lt;110&gt; 联邦科技产业研究组织

&lt;120&gt; 淀粉中具有增加了直链淀粉含量的水稻及水稻制品

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2739

&lt;212&gt; DNA

<213> 水稻亚种 *Oryza sativa*

&lt;223&gt; sbeI cDNA

&lt;400&gt; 1

Gccaccgaca	tccgccgcaa	tgcctgtgtct	cacctcctct	tectcctcctg	cgcccgcctcc	60
gctccttccc	tctctcgcctg	atcgaccgag	cccgggaatc	gcgggcgggg	gtggcaatgt	120
tcgcctgagc	gtgggtttctt	cgccgcgcgc	gtcgtggcct	ggaaagggtca	agaccaattt	180
ctcagttcct	gcgactgcgc	gaaaaaacia	aacctggtg	actgttgttg	aggaggtcga	240
ccaccttccc	atatatgatc	tggaccctaa	gttgaggagaa	ttcaaggatc	acttcaacta	300
taggataaaa	agatacctcg	accagaaatg	cctgattgaa	aaacatgagg	ggggccttga	360
agaattttct	aaaggctatt	tgaagtttgg	gattaataca	gttgatgggt	ccacaataata	420
tcgtgaatgg	gcgcctgctg	cacaagaagc	acagctcatt	gggtgagttca	ataactggaa	480
tggtgcaaaa	cacaagatgg	agaaggataa	atttggcatt	tgggtcaatca	agatttcaca	540
tgtcaatggg	aagcctgccca	tccctcacaa	ttccaagggt	aaattttcgt	ttaggcattg	600
gggtggagca	tgggttgatc	gtattcccgc	atggattcgt	tatgcaactt	ttgatgcctc	660
taaaatttga	gctcccatatg	atgggtgtaca	ctgggatcct	ccagcctgtg	aaaggtagct	720
gtttaagcat	cctcgacctc	caaaaacctga	tgctccacgc	atctatgagg	ctcatgtggg	780
gatgagtggg	gaagagccag	aagtaagcac	atcacagagaa	tttgacagaca	atgtgttacc	840
acgcatacgg	gcaaataaact	acaacacagt	tcagttaatg	gcaatcatgg	aacattccta	900
ctatgcttct	tttgggtatc	acgtgacaaa	ttttttcgc	gtcagcagca	gatcaggaac	960
accagaggat	ctgaaatatc	ttgttgacaa	ggcacatagt	ttaggattac	gagttctgat	1020
ggatgttgtc	catagccatg	cgagtataaa	tgtgaccgat	gggtctaaatg	gctatgacgt	1080
tggacaaaac	actcatgagt	cttatttttca	tacaggagat	aggggctacc	ataaactctg	1140
ggatagtctg	ctgttcaact	atgccaatgt	ggaggcttca	agattttcttc	tttctaattt	1200
gagatattgg	atggacgaat	tcattgtttga	tggcttccga	tttgatgggg	ttacatcaat	1260
gctataccat	caccatggta	tcaataagggt	atttactgga	aactacaagg	agtatttcag	1320
tttggatacc	gatgtggatg	caattgtttta	catgatgctc	gcaaaccatt	taatgcataa	1380
actcttgcgc	gaagcaacta	ttgttgctga	agatgtttcg	ggcatgccag	tgctttgtcg	1440
gccagttgat	gaaggtggag	tagggtttga	cttccgcctg	gcaatggcca	ttcctgatag	1500
atggattgac	tacctgaaga	acaaagagga	ccgcaaatgg	tcaatgagtg	aaatagtgca	1560
aactttgact	aacaggagat	atagcaaaaa	atgcatgtgc	tatgcccaga	gccatgatca	1620
gtccattgtt	ggtgacaaga	ctatagcatt	tctcttgatg	gacaaggaaa	tgtacactgg	1680
catgtcagac	ttgcagcctg	cttcacctac	catcaaccgt	ggcatatgcac	tccaaaagat	1740
gattcacctc	attacgatgg	cccttgaggg	tgatggctac	ttaaattttta	tgggcaatga	1800
gttttgccat	ccagaatgga	ttgactttcc	aagagaaggc	aacaactgga	gctatgataa	1860
atgcagacgt	cagtggagcc	ttgtcgacac	tgatcaccct	cgatacaagt	atatgaatgc	1920
atttgatcaa	gcaatgaatg	cactcgagga	ggaattttcc	ttcctgtcat	catcaaagca	1980
gattgttagc	gacatgaacg	agaaagataa	ggttatgttc	tttgaacgtg	gagatttggg	2040
ttttgttttc	aattttcatc	ccaacaaaac	ttacaagggt	tacaaagtcg	gatgtgactt	2100
gcccgggaag	tacagagtag	ctctggactc	tgatgttttg	gtcttttggtg	gccatggaag	2160
agtttgccat	gatgtggatc	acttcacgtc	tcccagaggga	atgccaggag	taccagaaac	2220
aaatttcaac	aaccgcctta	actcattcaa	agtcctttcc	ccgcccgtta	cctgtgtggc	2280
ttactatcgc	gttgatgaag	atcgtgaaga	gctcaggagg	gggtggagcag	ttgcttctgg	2340
aaagattgtt	acagagtata	tcgatgttga	agcaacaagt	ggggagacta	tctctggtgg	2400
ctggaagggc	tccgagaagg	acgatgttgg	caagaaaggg	atgaagtttg	tgtttcggtc	2460
ttctgacgaa	gactgcaaat	gaagcatcag	atttcttgat	caggagcaac	tgttggtgcc	2520
cttgtaattct	ggagatcctg	gcttgccttg	gacttgggtg	tggttcttta	gcagttgcta	2580
tgtacctatc	tatgatattga	actttatgta	tagtttcgct	taaagaaaaga	ataagcagtg	2640
atgatgtggc	cttaaacctg	agctgcacaa	gcctaatgta	aaaataaagt	ttcaggcttt	2700
catccagaat	aaaacagctg	ttcattttacc	atctcaaaa			2739

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3015

&lt;212&gt; DNA

<213> 水稻亚种 *Oryza sativa*

&lt;223&gt; sbeIIa cDNA

&lt;400&gt; 2

cttgactccc	cccactcctc	cctcgtgctg	ctcctcctcg	tcgctcggct	cgaggcgcg	60
catfttgcgc	gggagggatc	tgcgcgcgag	tgcgtgcggg	caggcgggcg	gggagcacgc	120
accgggggat	ggcgtcgttc	gcggtgtccg	gcgcgaggct	cggggtcgtg	cgggcggggg	180
gcggcgggcg	cggcgggggt	ggcccggcgg	cgcgatccgg	cggggtggac	ttgcccgtcg	240
tgctcttcag	gaggaaggac	tccttctcac	gtggcgttgt	gagctgcgcg	ggtgctcctg	300
ggaagggtgt	ggtgcctggc	ggtgggagcg	acgacttgct	gtcctctgcg	gaaccagacg	360
tggaaactca	agagcaacct	gaagaatctc	agatacctga	tgataataaa	gtaaaacctt	420
ttgaggagga	ggaagagatt	ccagcagtg	cagaagcaag	cataaagggt	gtggctgaag	480
acaaacttga	atcttcagaa	gtgattcaag	acattgagga	aaatgtgact	gaggggtgtga	540
tcaaagatgc	tgatgaacca	actgtggagg	ataaaccacg	agttatccca	ccaccaggag	600
atgggcagaa	gatataccaa	attgacccaa	tgctggaagg	atttcggaac	catcttgact	660
accgatacag	tgaatacaag	agaatgcgtg	cagctattga	ccaacatgaa	ggtggccttg	720



atgcatttttc	tcgtgggttac	gaaaagcttg	gattcaccctg	cagcgctgaa	ggcattacct	780
accgagaatg	ggcaccttga	gcacagtctg	cagcattagt	aggtgacttc	aacaatttga	840
acccaaatgc	agatactatg	accagaaatg	agtatgggtg	ttgggagatt	tccctgccta	900
acaatgctga	tggatccctt	gctatttcctc	atggctcacg	tgtaaagatt	cggatggata	960
caccaatctgg	cgtaaaggat	tcaatttcctg	cctggattaa	gtttgctgtg	caggctccag	1020
gtgaaataacc	gtacaaacgg	atataattatg	atccacctga	agaagaaaaa	tatgtattcc	1080
aacatcctca	acctaaccga	ccaaatttcgc	tgccgataata	tgaatcacat	attggaatga	1140
gtagcccgga	accgaagata	aacacataatg	ctaaatttttag	ggatgaggtg	ctaccaagaa	1200
ttaaaaagct	tgggtacaat	gctgtacaga	taatggcaat	ccaggagcac	tcttattacg	1260
caagcttttgg	gtatcatgtt	actaaacttct	ttgcgcgaag	tagccgtttc	ggaaccccag	1320
aagacttgaa	atctctgatt	gataaaagctc	acgagcttgg	tttgccttga	cttatggata	1380
ttgttcacag	tcattgcata	aacaataccc	tggaatgggtt	gaatgggttt	gatgggtactg	1440
atacacatta	cttccatggg	ggaccacggg	gtcatcactg	gatgtgggat	tctcgcctgt	1500
tcaactatgg	gagttgggaa	gtttttaagat	atcttactgtc	gaatgcaagg	tggtggcttg	1560
aagaatacaa	gtttgatggg	tttcgattttg	atgggggtgac	ctccatgatg	tatactcatc	1620
atggttttaca	ggtggcatttt	actggcaact	atggcgaata	ttttggattt	gctactgatg	1680
ttgatgacag	agtttacttg	atgtctggtag	acgactcaat	tcatgggctt	tatcctgagg	1740
ctgtagccat	tggtgaagat	gtcagcggga	tgcccacatt	ttgtattcct	gttcaagatg	1800
gtgggtgttgg	ttttgactat	cgttttgcata	tggtctgtacc	ggacaaatgg	atcgaactcc	1860
tcaagcaaaag	tgacgaatat	tggaataatgg	gtgatatcgt	gcacacccfa	acgaatagaa	1920
ggtggtcaga	gaagtgtgtt	acttatgcag	aaagtcatga	ccaagcacta	gttgggtgaca	1980
agactatttgc	attctgtgtt	atggataaagg	atatgtatga	ttttatggct	ctagacagac	2040
cttcaacacc	tcgcatfaga	cgtaggtag	cattacataa	aatgattagg	ctgttcacca	2100
tgggcttagg	aggcgaaggc	tatcttaatt	tcatgggaaa	tgagtgtggg	catcctgaat	2160
ggatagatttt	cccaagaggc	ccgcaaatgc	ttccaaatgg	ctcggctctc	ccaggaaaca	2220
actacagttt	tgataaaatgc	cgtagtagat	ttgaccttgg	agatgcagat	tatcttagat	2280
atcatgggtat	gcaagagttt	gatcaggcca	tgacagcatct	tgaggaaaaa	tatggattca	2340
tgacatctga	gcaccagtat	atatcgcgca	aacacgagga	ggataaagggt	atcatcttcg	2400
agagaggaga	tttggtattc	gtgttcaact	tccactggag	taatagctat	tttgactatc	2460
gcgtcgggtt	tttaaagcct	ggaaagataca	agattgtgtt	ggactcagac	gatggcctct	2520
ttgggtggatt	cagtcggctt	gatcatgatg	ctgagtactt	cactgctgac	tgcccgcatg	2580
acaacagacc	atgttcatte	tcggtgtaca	ccccaaagcag	aaccgcccgc	gtgtatgcac	2640
ttacagagga	ctaattgatca	gctctgatca	ttgggggaac	aactcaaggg	agttgggtgg	2700
aatgacgccg	gaatacaact	caagtgaag	gtgaaaagaa	aggctgccct	gacgatgtga	2760
tttgaggggc	ttgtgtttca	tcgccaatgc	caggaaagatg	aggtagaaaa	gcctactgat	2820
gagctccctg	tttcgagtga	ctcgtgaagg	aaatagacca	gggtgaacgg	cttttttcag	2880
agctatacca	aaccatcct	atgttgcgca	ttcgcctgtag	ttttgtacat	aacgatatcg	2940
gttggcattt	gtatgtttat	gaataatctg	ttcgacagaa	atgtttttct	ccttgtattt	3000
agtgcataaa	aaaaa					3015
<210>	3					
<211>	2918					
<212>	DNA					
<213>	水稻亚种 <i>Oryza sativa</i>					
<223>	sbeIIb cDNA					
<400>	3					
cggegcacac	ccacacacccg	accaccaggc	agcgccctcct	cgcttttggct	ctcgcgtgag	60
gaggggtttag	gtggaagcag	agcgccggggg	ttgcccggggg	atccgatccg	gctgcgggtgc	120
ggcgagagatg	gcggcgccggg	cgctctgcggg	tcccgggagc	gcggcgggggc	tacgggcccgg	180
ggccgtgcgg	ttcccgcgtgc	cagccgggggc	ccggagctgg	cggtgcggcgg	cggagctccc	240
gacgtcgcgg	tcgctgctct	ccggccggag	attcccgggt	gccgtttcgg	tggggggttc	300
cgggggggcgc	gtggccgtgc	gcgcggcggg	cgctcaggg	gaggtgatga	tccccgaggg	360
cgagagcgac	gggatgcccgg	tttcagcagg	ttcagacgat	ctgcagttgc	cagccttaga	420
tgatgaattta	agcacggagg	ttggagctga	agttgagatt	gagtcactct	gagcaagtga	480
cgttgaaggc	gtgaagagag	tggttgaaga	attagctgtc	gagcagaaac	cacgagttgt	540
cccaccaaca	ggagatgggc	aaaaaataatt	ccagatggac	tctatgctta	atggctataa	600
gtaccatctt	gaatatcgat	atagcctata	taggagactg	cgttcagaca	ttgatcagta	660
tgaaggagga	ctggaacat	tttctcgcgg	ttatgagaag	tttggaattta	atcacagtgc	720
tgaagggtgtc	acttatcgag	aatgggctcc	cggggcacat	tctgcagcat	tagtaggtga	780
cttcaacaat	tggaaatccaa	atgcagaccg	catgagcaaa	aatgagtttg	gtgttttggg	840
gattttttctg	cctaacaatg	ctgatggctc	atctcctatt	ccacatggct	cacgtgtaaa	900
ggtgcgaatg	gaaactccat	ctggatataa	ggatctctatt	cctgcctgga	tcaagtactc	960
ttgtgcaggcc	gcaggagaaa	tcccatacaa	tggaatatata	tatgatcctc	ctgaagagga	1020
gaagtacata	ttcaagcatc	ctcaacctaa	aagaccaaag	tcaattgcgga	tatacgaaac	1080
tcatgtttgga	atgagtagca	cggagccaaa	gatcaacacg	tatgcaaact	ttagggatga	1140
ggtgctttcca	agaatcaaaa	agcttggata	caatgcagtg	caaataaatgg	caattcaaga	1200
gcatgcataat	tatggaagct	ttgggtacca	tgtaaccaat	ttctttgcac	caagtagtgc	1260
tttcgggacc	ccagaagatt	taaaatcatt	gattgataaa	gctcatgagc	ttgggttagt	1320
ttgtgctcatg	gatgttgttc	acagccatgc	gtcaataaat	accctagatg	ggttgaacgg	1380
ttttgatgggt	acagatacgc	attactttca	tagtggttca	cgcgcccatc	attggatgtg	1440
ggatttctcgc	cttttcaact	atgggaattg	ggaagtctta	agattttctac	tatccaatgc	1500
aagatggttg	ctcgaggagt	ataagtttga	tggtttcaga	tttgacgggtg	taacctcaat	1560
gatgtacact	catcatggat	tacaagttagc	atttacgggg	aactacagtg	aatacttttg	1620
attttgccact	gatgtctgat	cagtagttta	cttgatcttg	gtaaattgat	taattcatgg	1680
actttatcct	gaggccataa	ccatcggtag	agatgtcagt	ggaatgccta	catttgccct	1740
tcctgttcaa	gatgggtggg	ttgggtttga	ttatcgccct	catatggctg	ttcctgacaa	1800
atggattgaa	ctcctcaagc	aaagtgatga	atcttggag	atgggtgata	ttgtgcacac	1860
actgactaac	agaaggtggt	cagagaagtg	tggttacttat	gctgaaagtc	atgatcaagc	1920
actagttgggt	gacaaaacta	ttgcattctg	gttgatggac	aaggatatgt	atgattttat	1980
ggctctggac	agaccggcaa	cacctagcat	tgatcgtgga	atagcattgc	ataaaatgat	2040
tagacttatc	acaatgggggt	taggaggaga	aggctatctt	aactttatgg	gaaatgagtt	2100

cggacatcct	gaatggattg	at t t t t c c a a g	agctccacaa	gtacttccaa	atggtaaatt	2160
catcccaggg	aataacaaca	gttatgataa	atgccgtcga	agatttgacc	tgggtgatgc	2220
ggactatctt	aggtatcgtg	gcatgctaga	gtttgaccgc	gcgatgcagt	ctctcgagga	2280
aaaatatggg	ttcatgacat	cagaccacca	gtacatatct	cgaaagcatg	aagaggataa	2340
gatgattata	tttgagaagg	gagatctggt	at t t t g t g t t c	aacttccatt	ggagttaacag	2400
ctat t t t g a c	taccgtgttg	gttg t t t t a a a	gccagggaaa	tataagggtg	tcttggactc	2460
agatgctgga	ctctttggtg	gatttggcag	gatccatcac	actgcagagc	acttcactgc	2520
cgattgttca	catgacaaca	ggccctactc	gttctcagtt	tattctccta	gcagaacctg	2580
cgttgtctat	gctccagcgg	aatgagaaca	ccaagaggca	gcatgcaagt	gtgtgcggct	2640
gctagtgcga	aggagcaaga	aaaactagtt	gccagcaatc	tgtgaacggc	tttcctaggt	2700
tctgcttcga	tgaaatgccgg	atagactaga	cagcttgctt	ttgtgctttg	cgctcccaat	2760
ttgtagtttt	agtttgtgag	ggaaagaaac	gtttat t t t g t	aat t a t c t a t	ggctgtcgaa	2820
cggcgacgaa	accatgaacc	ccgtatattt	gttggtagcg	ttcgaactgc	cagttataca	2880
tagttctgca	cttctgtaca	tcttgtgatg	cttgaatc			2918

```

1  GCCACCGACA TCCGCCGCAA TGCTGTGTCT CACCTCCTCT TCCTCCTCCG CGCCCGCTCC
61  GCTCCTTCCC TCTCTCGCTG ATCGACCGAG CCCGGAATC GCGGGCGGGG GTGGCAATGT
121 TCGCCTGAGC GTGGTTTCTT CGCCGCGCCG GTCGTGGCCT GGAAAGGTCA AGACCAATTT
181 CTCAGTTCCT GCGACTGCGC GAAAAAACAA AACCATGGTG ACTGTTGTGG AGGAGGTCGA
241 CCACCTTCCT ATATATGATC TGGACCCTAA GTTGAGGAA TTCAAGGATC ACTTCAACTA
301 TAGGATAAAA AGATACCTCG ACCAGAAATG CCTGATTGAA AAACATGAGG GGGGCCTTGA
361 AGAATTTTCT AAAGGCTATT TGAAGTTTGG GATTAATACA GTTGATGGTG CCACAATATA
421 TCGTGAATGG GCGCCTGCTG CACAAGAAGC ACAGCTCATT GGTGAGTTCA ATAAGTGGAA
481 TGGTGCAAAA CACAAGATGG AGAAGGATAA ATTTGGCATT TGGTCAATCA AGATTTTACA
541 TGTCAATGGG AAGCCTGCCA TCCCTCACAA TTCCAAGGTT AAATTTTCGCT TTAGGCATGG
601 GGGTGGAGCA TGGGTTGATC GTATTCCCGC ATGGATTTCG TATGCAACTT TTGATGCCTC
661 TAAATTTGGA GCTCCATATG ATGGTGTACA CTGGGATCCT CCAGCCTGTG AAAGGTACGT
721 GTTTAAGCAT CCTCGACCTC CAAAACCTGA TGCTCCACGC ATCTATGAGG CTCATGTGGG
781 GATGAGTGGT GAAGAGCCAG AAGTAAGCAC ATACAGAGAA TTTGCAGACA ATGTGTTACC
841 ACGCATACGG GCAAATAACT ACAACACAGT TCAGTTAATG GCAATCATGG AACATTCCTA
901 CTATGCTTCT TTTGGGTATC ACGTGACAAA TTTTTCGCA GTCAGCAGCA GATCAGGAAC
961 ACCAGAGGAT CTGAAATATC TTGTTGACAA GGCACATAGT TTAGGATTAC GAGTTCTGAT
1021 GGATGTTGTC CATAGCCATG CGAGTAATAA TGTGACCGAT GGTCTAAATG GCTATGACGT
1081 TGGACAAAAC ACTCATGAGT CTTATTTTCA TACAGGAGAT AGGGGCTACC ATAAACTCTG
1141 GGATAGTCGT CTGTTCAACT ATGCCAATTG GGAGGTCTTA AGATTTCTTC TTTCTAATTT
1201 GAGATATTGG ATGGACGAAT TCATGTTTGA TGGCTTCCGA TTTGATGGGG TTACATCAAT
1261 GCTATACCAT CACCATGGTA TCAATAAGGG ATTTACTGGA AACTACAAGG AGTATTTTCA
1321 TTTGGATACC GATGTGGATG CAATTGTTTA CATGATGCTC GCAAACCATT TAATGCATAA
1381 ACTCTTGCCG GAAGCAACTA TTGTTGCTGA AGATGTTTCG GGCATGCCAG TGCTTTGTCTG
1441 GCCAGTTGAT GAAGGTGGAG TAGGGTTTGA CTTCCGCTG GCAATGGCCA TTCCTGATAG
1501 ATGGATTGAC TACCTGAAGA ACAAAGAGGA CCGCAAATGG TCAATGAGTG AAATAGTGCA
1561 AACTTTGACT AACAGGAGAT ATACAGAAAA ATGCATTGCC TATGCCGAGA GCCATGATCA
1621 GTCCATTGTT GGTGACAAGA CTATAGCATT TCTCTTGATG GACAAGGAAA TGTACACTGG
1681 CATGTCAGAC TTGCAGCCTG CTTACCTAC CATCAACCGT GGCATTGCAC TCCAAAAGAT
1741 GATTCACCTC ATTACGATGG CCCTTGAGAG TGATGGCTAC TTAAATTTTA TGGGCAATGA
1801 GTTTGGCCAT CCAGAATGGA TTGACTTTCC AAGAGAAGGC AACAACTGGA GCTATGATAA
1861 ATGCAGACGT CAGTGGAGCC TTGTCGACAC TGATCACCTT CGATACAAGT ATATGAATGC
1921 ATTTGATCAA GCAATGAATG CACTCGAGGA GGAATTTTCC TTCCTGTCAT CATCAAAGCA
1981 GATTGTTAGC GACATGAACG AGAAAGATAA GGTTATTGTC TTTGAACGTG GAGATTTGGT
2041 TTTTGTTTTT AATTTTCATC CCAACAAAAC TTACAAGGGT TACAAAGTCG GATGTGACTT
2101 GCCCGGGAAG TACAGAGTAG CTCTGGACTC TGATGCTTTG GTCTTTGGTG GCCATGGAAG
2161 AGTTGGCCAT GATGTGGATC ACTTCACGTC TCCCGAGGGA ATGCCAGGAG TACCAGAAAC
2221 AAATTTCAAC AACCGCCCTA ACTCATTCOA AGTCCTTTCC CCGCCCCGTA CCTGTGTGGC
2281 TTAATATCGC GTTGATGAAG ATCGTGAAGA GCTCAGGAGG GGTGGAGCAG TTGCTTCTGG
2341 AAAGATTGTT ACAGAGTATA TCGATGTTGA AGCAACAAGT GGGGAGACTA TCTCTGGTGG
2401 CTGGAAGGGC TCCGAGAAGG ACGATTGTGG CAAGAAAGGG ATGAAGTTTG TGTTCGGTC
2461 TTCTGACGAA GACTGCAAAT GAAGCATCAG ATTTCTTGAT CAGGAGCAAC TGTTGGTGCC
2521 CTTGTAATCT GGAGATCCTG GCTTGCCCTG GACTTGCTTG TGGTTCTTTA GCAGTTGCTA
2581 TGTACCTATC TATGATATGA ACTTTATGTA TAGTTCGCCT TAAAGAAAGA ATAAGCAGTG
2641 ATGATGTGGC CTTAAACCTG AGCTGCACAA GCCTAATGTA AAAATAAAGT TTCAGGCTTT
2701 CATCCAGAAT AAAACAGCTG TTCATTTACC ATCTCAAAA

```

图 1

```

1  CTTGACTCCC CCCACTCCTC CCTCGTGCTG CTCCTCCTCG TCGCTCGGCT CGAGGCGCGG
61 CATTTGCGGC GGGAGGGATC TGCGCGCGAG TGCGTGCGGG CAGGCGGCGG GGGAGCACGC
121 ACCGGGGGAT GCGGTCGTTC GCGGTGTCCG GCGCGAGGCT CGGGGTCTGT CGGGCGGGGG
181 GCGGCGGCGG CGGCGGGGGT GGCCCGGCGG CGCGATCCGG CGGGGTGGAC TTGCCGTCGG
241 TGCTCTTCAG GAGGAAGGAC TCCTTCTCAC GTGGCGTTGT GAGCTGCGCG GGTGCTCCTG
301 GGAAGGTGCT GGTGCCTGGC GGTGGGAGCG ACGACTTGCT GTCCTCTGCG GAACCAGACG
361 TGGAAACTCA AGAGCAACCT GAAGAATCTC AGATACCTGA TGATAATAAA GTAAAACCTT
421 TTGAGGAGGA GGAAGAGATT CCAGCAGTGG CAGAAGCAAG CATAAAGGTT GTGGCTGAAG
481 ACAAACCTGA ATCTTCAGAA GTGATTCAAG ACATTGAGGA AAATGTGACT GAGGGTGTGA
541 TCAAAGATGC TGATGAACCA ACTGTGGAGG ATAAACCACG AGTTATCCCA CCACCAGGAG
601 ATGGGCAGAA GATATACCAA ATTGACCCAA TGCTGGAAGG ATTTCGGAAC CATCTTGAAT
661 ACCGATACAG TGAATACAAG AGAATGCGTG CAGCTATTGA CCAACATGAA GGTGGCTTGG
721 ATGCATTTTC TCGTGGTTAC GAAAAGCTTG GATTCACCCG CAGCGCTGAA GGCATTACCT
781 ACCGAGAATG GGCACCTGGA GCACAGTCTG CAGCATTAGT AGGTGACTTC AACAAATTGGA
841 ACCCAAATGC AGATACTATG ACCAGAAATG AGTATGGTGT TTGGGAGATT TCCCTGCCTA
901 ACAATGCTGA TGGATCCCCT GCTATTCCTC ATGGCTCACG TGTAAGATT CGGATGGATA
961 CACCATCTGG CGTAAAGGAT TCAATTCCTG CCTGGATTAA GTTTGCTGTG CAGGCTCCAG
1021 GTGAAATACC GTACAACGGT ATATATTATG ATCCACCTGA AGAAGAAAAA TATGTATTCC
1081 AACATCCTCA ACCTAAACGA CCAAATTCGC TGCGGATATA TGAATCACAT ATTGGAATGA
1141 GTAGCCCGGA ACCGAAGATA AACACATATG CTAATTTTAG GGATGAGGTG CTACCAAGAA
1201 TTA AAAAGCT TGGGTACAAT GCTGTACAGA TAATGGCAAT CCAGGAGCAC TCTTATTACG
1261 CAAGCTTTGG GTATCATGTT ACTAACTTCT TTGCGCCAAG TAGCCGTTTC GGAACCCAG
1321 AAGACTTGAA ATCTCTGATT GATAAAGCTC ACGAGCTTGG TTTGCTTGTA CTTATGGATA
1381 TTGTTACAG TCATGCATCA AACAATACCC TGGATGGTTT GAATGGTTTT GATGGTACTG
1441 ATACACATTA CTTCCATGGT GGACCACGGG GTCATCACTG GATGTGGGAT TCTCGCCTGT
1501 TCAACTATGG GAGTTGGGAA GTTTTAAGAT ATTTACTGTC GAATGCAAGG TGGTGGCTTG
1561 AAGAATACAA GTTTGATGGG TTTCGATTTG ATGGGGTGAC CTCCATGATG TATACTCATC
1621 ATGGTTTACA GGTGGCATT ACTGGCAACT ATGGCGAATA TTTTGGATTT GCTACTGATG
1681 TTGATGCAGT AGTTTACTTG ATGCTGGTGA ACGATCTAAT TCATGGGCTT TATCCTGAGG
1741 CTGTAGCCAT TGGTGAAGAT GTCAGCGGGA TGCCACATT TTGTATTCCT GTTCAAGATG
1801 GTGGTGTTGG TTTTGACTAT CGTTTGATA TGGCTGTACC GGACAAATGG ATCGAACTCC
1861 TCAAGCAAAG TGACGAATAT TGGAAAATGG GTGATATCGT GCACACCCTA ACGAATAGAA
1921 GGTGGTCAGA GAAGTGTGTT ACTTATGCAG AAAGTCATGA CCAAGCACTA GTTGGTGACA
1981 AGACTATTGC ATTCTGGTTG ATGGATAAGG ATATGTATGA TTTTATGGCT CTAGACAGAC
2041 CTTCAACACC TCGCATTGAT CGTGGGATAG CATTACATAA AATGATTAGG CTTGTCACCA
2101 TGGGCTTAGG AGGCGAAGGC TATCTTAATT TCATGGGAAA TGAGTTTGGG CATCCTGAAT
2161 GGATAGATTT CCCAAGAGGC CCGCAAAGTC TTCCAAATGG CTCGGTCCTC CCAGGAAACA
2221 ACTACAGTTT TGATAAATGC CGTCGTAGAT TTGACCTTGG AGATGCAGAT TATCTTAGAT
2281 ATCATGGTAT GCAAGAGTTT GATCAGGCCA TGCAGCATCT TGAGGAAAAA TATGGATTCA
2341 TGACATCTGA GCACCAGTAT ATATCGCGCA AACACGAGGA GGATAAGGTG ATCATCTTCG
2401 AGAGAGGAGA TTTGGTATTC GTGTTCAACT TCCACTGGAG TAATAGCTAT TTTGACTATC
2461 GCGTCGGTTG TTTAAAGCCT GGAAAGTACA AGATTGTGTT GGAATCAGAC GATGGCCTCT
2521 TTGGTGGATT CAGTCGGCTT GATCATGATG CTGAGTACTT CACTGCTGAC TGGCCGCATG
2581 ACAACAGACC ATGTTTCATT TCGGTGTACA CCCAAGCAG AACCGCCGTC GTGTATGCAC
2641 TTACAGAGGA CTAATGATCA GCTCTGATCA TTGGGGGAAC AACTCAAGGG AGTTGGTGGT
2701 AATGACGCCG GAATACAAC CAAGTGAAAG GTGAAAAGAA AGGCTGCCCT GACGATGTGA
2761 TTTGAGGGGC TTGTGTTTCA TCGCCAATGC CAGGAAGATG AGGTAGAAAA GCCTACTGAT
2821 GAGCTCCTGT TTTCGAGTGA CTCGTGAAGG AAATAGACCA GGGTGAACGG CTTTTTTTCT
2881 AGCTATACCA AACCCATCCT ATGTTGCGCA TTCGCTGTAG TTTTGTACAT AACGATATCG
2941 GTTGGCATT GTATGTTTAT GAATAATCTG TTCGACAGAA ATGTTTTTCT CCTTGTATTT
3001 AGTGCTCAAA AAAAA

```

图 2



```

1  CGGCGCACAC CCACACACCG ACCACCAGGC AGCGCCTCCT CGCTTTGGCT CTCGCGTGAG
61  GAGGGTTTAG GTGGAAGCAG AGCGCGGGGG TTGCCGGGGG ATCCGATCCG GCTGCGGTGC
121 GGGCGAGATG GCGGCGCCGG CGTCTGCGGT TCCCGGGAGC GCGGCGGGGC TACGGGCGGG
181 GGCCGTGCGG TTCCCCGTGC CAGCCGGGGC CCGGAGCTGG CGTGCGGCGG CGGAGCTCCC
241 GACGTCGCGG TCGCTGCTCT CCGGCCGGAG ATTCCCCGGT GCCGTTGCGG TGGGGGGTTC
301 CGGGGGGCGC GTGGCCGTGC GCGCGGCGGG CGCGTCAGGG GAGGTGATGA TCCCCGAGGG
361 CGAGAGCGAC GGGATGCCGG TTTCAGCAGG TTCAGACGAT CTGCAGTTGC CAGCCTTAGA
421 TGATGAATTA AGCACGGAGG TTGGAGCTGA AGTTGAGATT GAGTCATCTG GAGCAAGTGA
481 CGTTGAAGGC GTGAAGAGAG TGGTTGAAGA ATTAGCTGCT GAGCAGAAAC CACGAGTTGT
541 CCCACCAACA GGAGATGGGC AAAAAATATT CCAGATGGAC TCTATGCTTA ATGGCTATAA
601 GTACCATCTT GAATATCGAT ATAGCCTATA TAGGAGACTG CGTTCAGACA TTGATCAGTA
661 TGAAGGAGGA CTGGAAACAT TTTCTCGCGG TTATGAGAAG TTTGGATTTA ATCACAGTGC
721 TGAAGGTGTC ACTTATCGAG AATGGGCTCC CGGGGCACAT TCTGCAGCAT TAGTAGGTGA
781 CTTCAACAAT TGGAATCCAA ATGCAGACCG CATGAGCAAA AATGAGTTTG GTGTTTGGGA
841 GATTTTTCTG CCTAACAATG CTGATGGCTC ATCTCCTATT CCACATGGCT CACGTGTAAA
901 GGTGCGAATG GAAACTCCAT CTGGTATAAA GGATTCTATT CCTGCCTGGA TCAAGTACTC
961 TGTGCAGGCC GCAGGAGAAA TCCCATACAA TGGAATATAT TATGATCCTC CTGAAGAGGA
1021 GAAGTACATA TTCAAGCATC CTCAACCTAA AAGACCAAAG TCATTGCGGA TATACGAAAC
1081 TCATGTTGGA ATGAGTAGCA CGGAGCCAAA GATCAACACG TATGCAAAC TTAGGGATGA
1141 GGTGCTTCCA AGAATCAAAA AGCTTGGATA CAATGCAGTG CAAATAATGG CAATTCAAGA
1201 GCATGCATAT TATGGAAGCT TTGGGTACCA TGTCACCAAT TTCTTTGCAC CAAGTAGTCG
1261 TTTCGGGACC CCAGAAGATT TAAAGTCATT GATTGATAAA GCTCATGAGC TTGGTTTAGT
1321 TGTGCTCATG GATGTTGTTC ACAGCCATGC GTCAAATAAT ACCCTAGATG GGTGAAACGG
1381 TTTTGATGGT ACAGATACGC ATTACTTTCA TAGTGTTTCA CGCGGCCATC ATTGGATGTG
1441 GGATTCTCGC CTTTCAACT ATGGGAATTG GGAAGTTCTA AGATTTCTAC TATCCAATGC
1501 AAGATGGTGG CTCGAGGAGT ATAAGTTTGA TGGTTTCAGA TTTGACGGTG TAACCTCAAT
1561 GATGTACACT CATCATGGAT TACAAGTAGC ATTTACGGGG AACTACAGTG AATACTTTGG
1621 ATTTGCCACT GATGCTGATG CAGTAGTTTA CTTGATGCTG GTAAATGATT TAATTCATGG
1681 ACTTTATCCT GAGGCCATAA CCATCGGTGA AGATGTCAGT GGAATGCCTA CATTTGCCCT
1741 TCCTGTTCAA GATGGTGGGG TTGGTTTTGA TTATCGCCTT CATATGGCTG TTCCTGACAA
1801 ATGGATTGAA CTCCTCAAGC AAAGTGATGA ATCTTGGAAG ATGGGTGATA TTGTGCACAC
1861 ACTGACTAAC AGAAGGTGGT CAGAGAAGTG TGTTACTTAT GCTGAAAGTC ATGATCAAGC
1921 ACTAGTTGGT GACAAAATA TTGCATTCTG GTTGATGGAC AAGGATATGT ATGATTTTAT
1981 GGCTCTGGAC AGACCGGCAA CACCTAGCAT TGATCGTGGA ATAGCATTGC ATAAAATGAT
2041 TAGACTTATC ACAATGGGGT TAGGAGGAGA AGGCTATCTT AACTTTATGG GAAATGAGTT
2101 CGGACATCCT GAATGGATTG ATTTTCCAAG AGCTCCACAA GTACTTCCAA ATGGTAAATT
2161 CATCCAGGG AATAACAACA GTTATGATAA ATGCCGTCGA AGATTTGACC TGGGTGATGC
2221 GGAATATCTT AGGTATCGTG GCATGCTAGA GTTTGACCGC GCGATGCAGT CTCTCGAGGA
2281 AAAATATGGG TTCATGACAT CAGACCACCA GTACATATCT CGAAAGCATG AAGAGGATAA
2341 GATGATTATA TTTGAGAAGG GAGATCTGGT ATTTGTGTTC AACTTCCATT GGAGTAACAG
2401 CTATTTTGAC TACCGTGTTG GTTGTTTAAA GCCAGGGAAA TATAAGGTGG TCTTGACTC
2461 AGATGCTGGA CTCTTTGGTG GATTTGGCAG GATCCATCAC ACTGCAGAGC ACTTCACTGC
2521 CGATTGTTCA CATGACAACA GGCCCTACTC GTTCTCAGTT TATTCTCCTA GCAGAACCTG
2581 CGTTGTCTAT GCTCCAGCGG AATGAGAACA CCAAGAGGCA GCATGCAAGT GTGTGCGGCT
2641 GCTAGTGCGA AGGAGCAAGA AAAACTAGTT GCCAGCAATC TGTGAACGGC TTTCTAGGT
2701 TCTGCTTCGA TGAATGCCGG ATAGACTAGA CAGCTTGCTT TTGTGCTTTG CGCTCCCAAT
2761 TTGTAGTTTT AGTTTGTGAG GGAAAGAAAC GTTTATTTGT AATTATCTAT GGCTGTGCGA
2821 CGGCGACGAA ACCATGAACC CCGTATATTT GTTGGTACCG TTCGAACTGC CAGTTATACA
2881 TAGTTCTGCA CTTCTGTACA TCTTGTGATG CTTGAATC

```

图 3

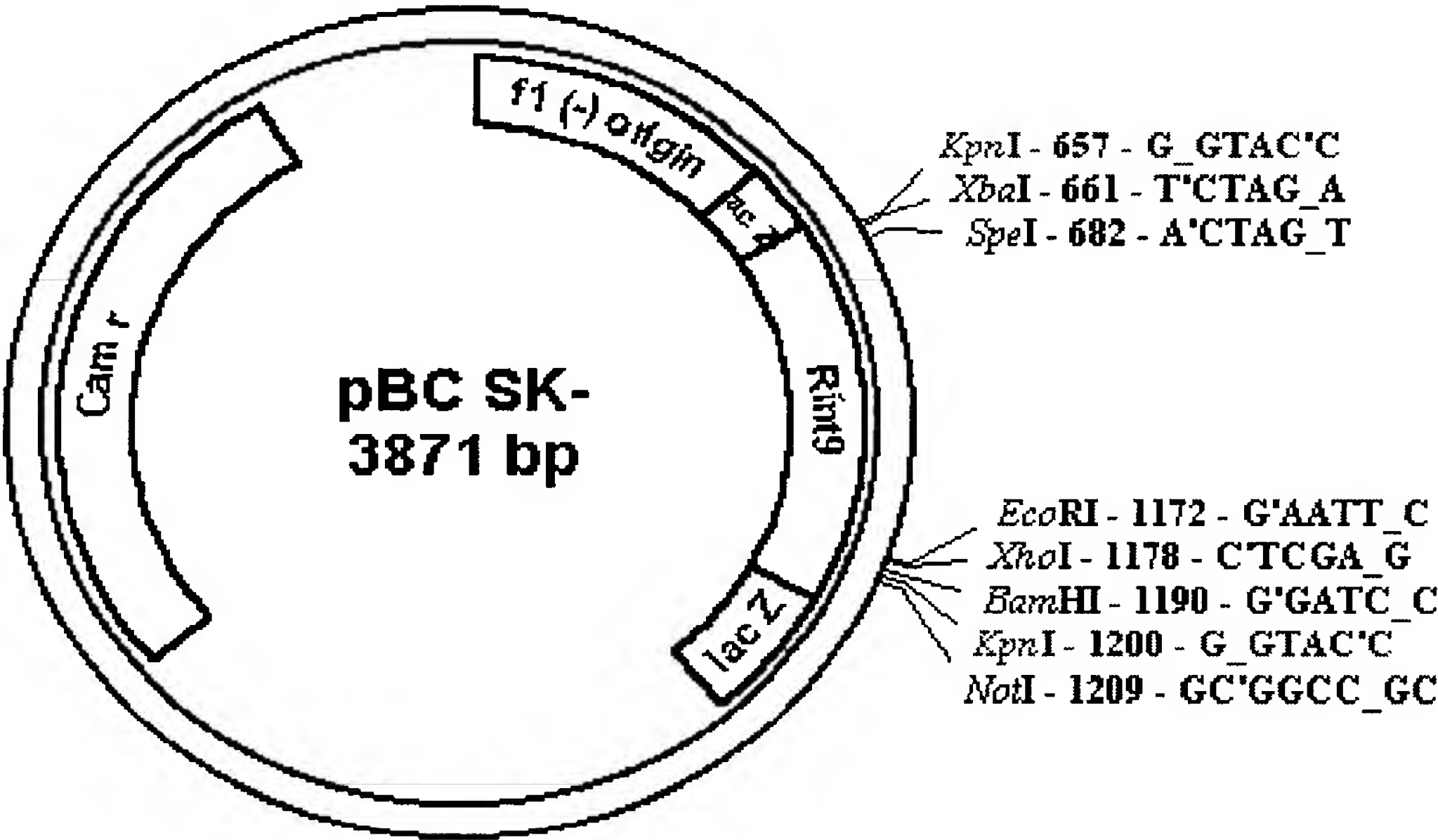


图 4

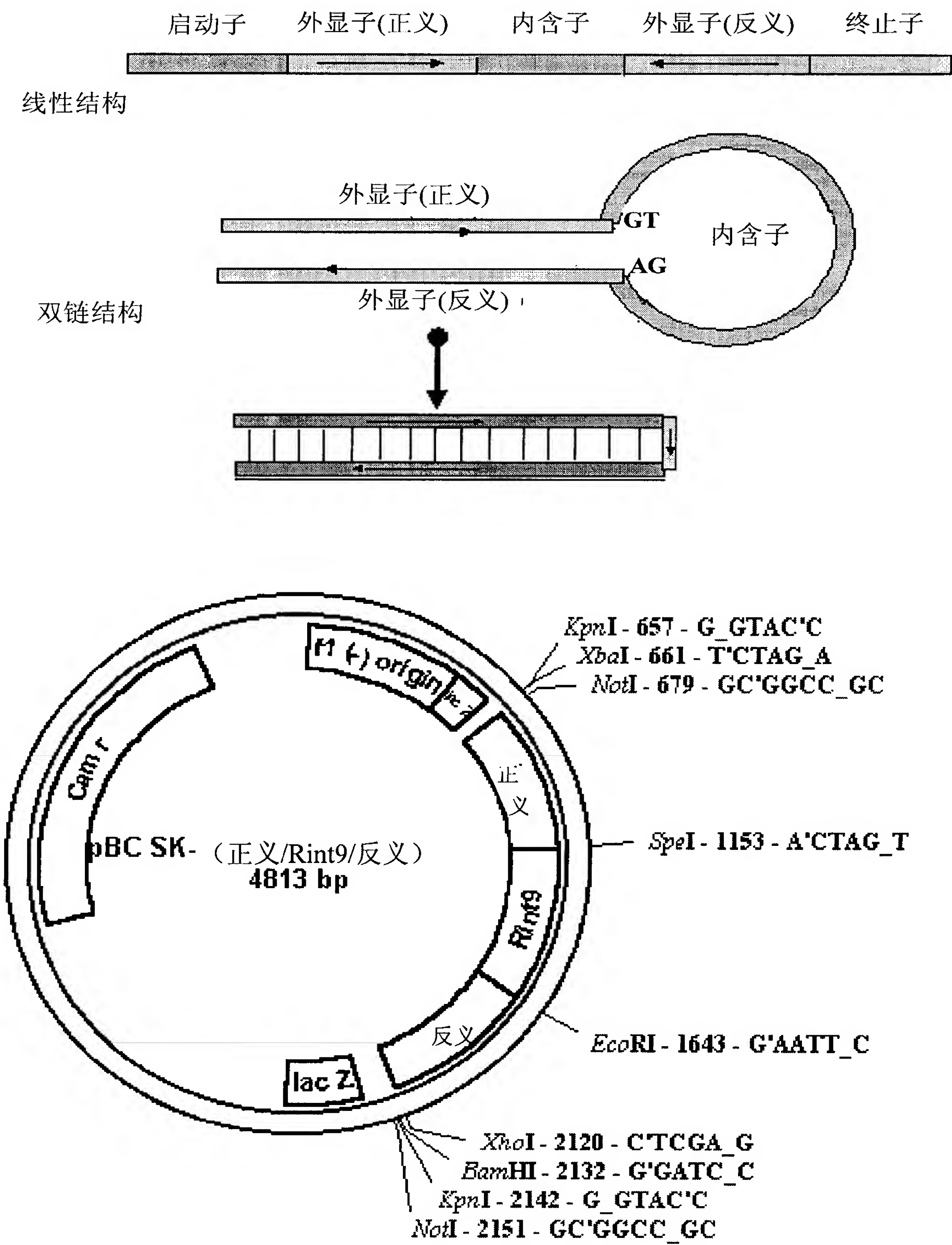


图 5

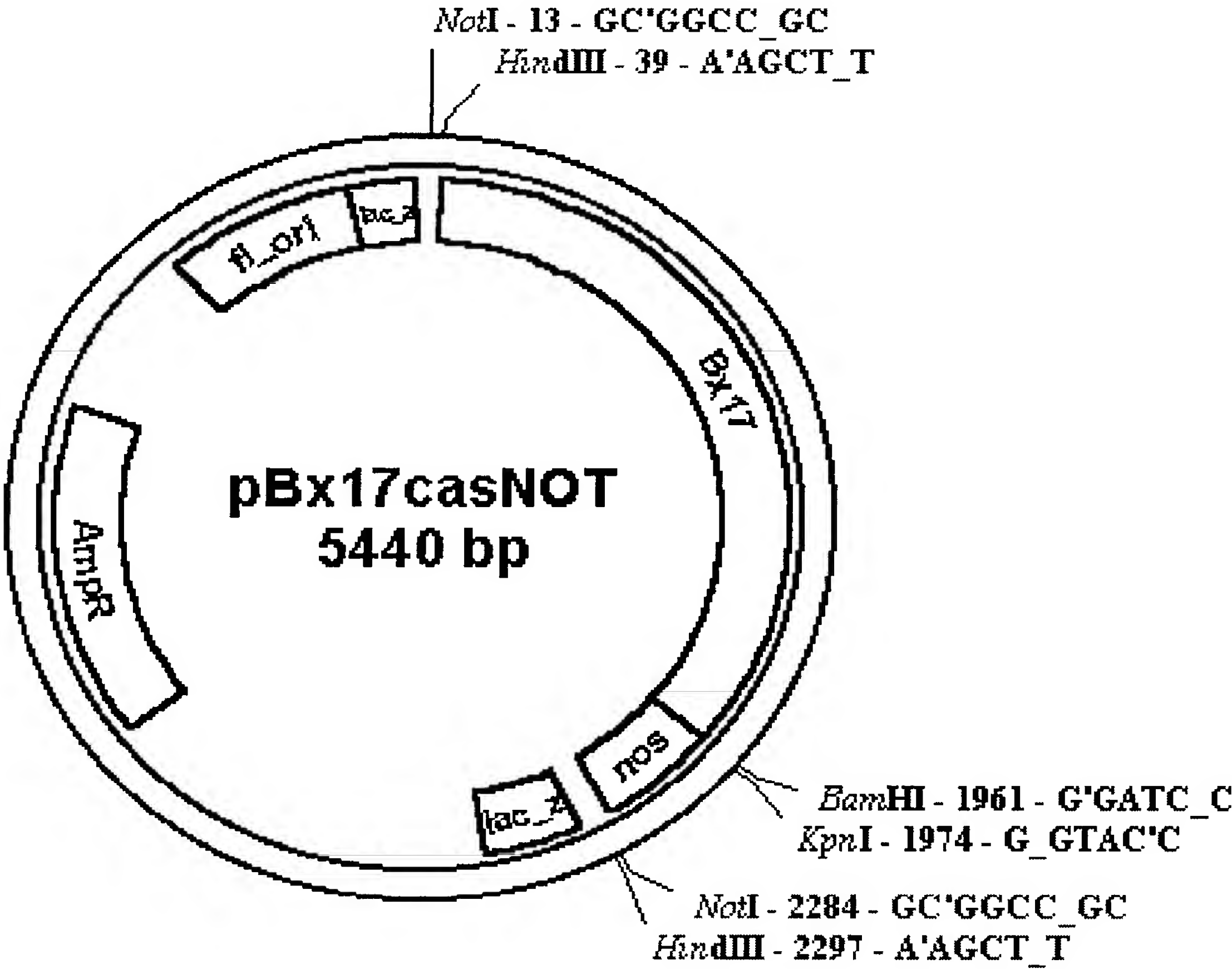


图 6



```

82  GCGCGGGGGTTGCCGGGGGATCCGATCCGGCTGCG.GTGCGGGCGAGATG 130
   |||||  |||| | ||||  |||| |  ||| ||||| ||| | |
55  gcgcggcatttgcggcgga.gggatctgcgcgcgagtgcggtgcgggcag 103

131 GCGGC.....GCCGGCTCTGCGGTTCCCGGGA 158
   |||||  | || |||  |||||  || ||
104 gcggcgggggagcacgcaccgggggatggcgctcggtcgcggtgtcc.ggc 152

159 GCGCGGCGGGGCTACGGGCGGGGGCCGTGCGGTTCCCCGTGCCAGCCGGG 208
   ||| ||| ||  || ||||| | | ||||  | | | | || |||
153 gcgaggctcggggtcggtgcgggcggggggcg...cggcggcggcgggg 198

209 GCCCGGAGCTGGCGTGCGGCGGCGGAGCTCCCGACGTCGCGGTCGCTGCT 258
   |  |  |||| |  ||||| |  |  | || |||| ||||
199 gtggcccggcggcgcgatccggcgggg....tggaactgcccgtcggtgct 244

259 CTCCGGCCGGAGATTCCCGGTGCCGTTGCGGTGGGGGGTTCCGGGGGGC 308
   || | | |||  ||  | ||| | | || |||
245 cttcaggagga.....aggactccttctcacgtggcggtt..... 278

309 GCGTGGCCGTGCGCGCGGCGGGCGCGTCAGGGGAGGTGATGATCCCGAG 358
   ||| ||  ||||| ||  | ||| ||||| || | || |
279 .....gtgagctgcgcgggtgctcctgggaagggtgctggtgcctggc 320

359 GGCGAGAGCGACGGGATGCCGGTTTCAGCAGGTTTCAGACG..... 398
   || | ||||| ||| ||  || || |  |||||
321 ggtgggagcgcgacttgctgtcctctgcggaaccagacgtggaaactca 370

399 .....ATCTGCAGTTGCC.....AGCCT 416
   |||| ||| | ||  | |||
371 agagcaacctgaagaatct.cagatacctgatgataataaagtaaaacct 419

417 T.....AGATGATGAATTAAGCACGGAGGT 441
   |  || | ||| ||||  ||||
420 ttgaggaggaggaagagattccagcagtggcagaagcaagcataaagg 469

442 TGGAGCTGAAGTTGAGATTGAGTCATC.....TGGAG 473
   || ||||| |  |||| || ||  || |
470 tgtggctgaagacaaacttgaatcttcagaagtgattcaagacattgagg 519

474 CAAGTGACGTTGAAGGCGTGAAGAGAGTGGTTGAAGAATTAGCTGCTGAG 523
   || ||  ||| || |||| | || | ||| ||| | ||| |||
520 aaaatgtgactgaggggtgtgatcaaagatgctgatgaaccaactgtggag 569

524 CAGAAACACGAGTTGTCCCACCAACAGGAGATGGGCAAAAAATATTCCA 573
   | ||||| ||||| ||||| ||||| || |||| |||
570 gataaaccacgagttatcccaccaccaggagatgggcagaagataacca 619

574 GATGGACTCTATGCTTAATGGCTATAAGTACCATCTTGAATATCGATATA 623
   || ||| | |||| | || | | ||||| || |||| |
620 aattgaccaatgctggaaggatttcggaaccatcttgactaccgataca 669

624 GCCTATATAGGAGACTGCGTTCAGACATTGATCAGTATGAAGGAGGACTG 673
   | ||| | |||| |||| || ||||| || ||||| || ||
670 gtgaatacaagagaatgcgtgcagctattgaccaacatgaagggtggcttg 719

```

图 7

```

674 GAAACATTTTCTCGCGGTTATGAGAAGTTTGGATTTAATCACAGTGCTGA 723
    || ||||| ||||| || ||| ||||| | | ||| |||||
720 gatgcattttctcgtggttacgaaaagcttggattcaccgcgagcgctga 769
    .
724 AGGTGTCACCTTATCGAGAATGGGCTCCCGGGGCACATTCTGCAGCATTAG 773
    ||| | || || ||||| ||||| || || ||||| ||||| |||||
770 aggcattacctaccgagaatgggcacctggagcacagtctgcagcattag 819
    .
774 TAGGTGACTTCAACAATTGGAATCCAAATGCAGACCGCATGAGCAAAAAT 823
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
820 taggtgacttcaacaattggaacccaaatgcagatactatgaccagaaat 869
    .
824 GAGTTTGGTGTGTTGGGAGATTTTCTGCCTAACAATGCTGATGGCTCATC 873
    |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
870 gagtatggtgtttgggagatttcctgcctaacaatgctgatggatcccc 919
    .
874 TCCTATTCCACATGGCTCACGTGTAAAGGTGCGAATGGAAACTCCATCTG 923
    | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
920 tgctattcctcatggctcacgtgtaaagattcggatggatacaccatctg 969
    .
924 GTATAAAGGATTCTATTCCTGCCTGGATCAAGTACTCTGTGCAGGCCGCA 973
    | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
970 gcgtaaaggattcaattcctgcctggattaagtgtgctgtgcaggctcca 1019
    .
974 GGAGAAATCCCATACAATGGAATATATTATGATCCTCCTGAAGAGGAGAA 1023
    || ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1020 ggtgaaataccgtacaacggtatatattatgatccacctgaagaagaaaa 1069
    .
1024 GTACATATTCAAGCATCCTCAACCTAAAAGACCAAAGTCATTGCGGATAT 1073
    || ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1070 atatgtattccaacatcctcaacctaaacgaccaaattcgctgcggatat 1119
    .
1074 ACGAAACTCATGTTGGAATGAGTAGCACGGAGCCAAAGATCAACACGTAT 1123
    | ||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1120 atgaatcacatattggaatgagtagcccggaaccgaagataaacacatat 1169
    .
1124 GCAAACCTTAGGGATGAGGTGCTTCCAAGAATCAAAAAGCTTGGATACAA 1173
    || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1170 gctaatttttagggatgaggtgctaccaagaattaaaaagcttgggtacaa 1219
    .
1174 TGCAGTGCAAATAATGGCAATTCAAGAGCATGCATATTATGGAAGCTTTG 1223
    ||| || || ||||| ||||| || ||||| | ||||| | |||||
1220 tgctgtacagataatggcaatccaggagcactcttattacgcaagctttg 1269
    .
1224 GGTACCATGTCACCAATTTCTTTGCACCAAGTAGTCGTTTCGGGACCCCA 1273
    |||| ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1270 ggtatcatgttactaacttctttgcgccaagtagccgtttcggaacccca 1319
    .
1274 GAAGATTTAAAGTCATTGATTGATAAAGCTCATGAGCTTGGTTTAGTTGT 1323
    ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1320 gaagacttgaaatctctgattgataaagctcacgagcttggtttgcttgt 1369
    .
1324 GCTCATGGATGTTGTTTACAGCCATGCGTCAAATAATACCCTAGATGGGT 1373
    || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1370 acttatggatattgttcacagtcatgcatcaacaataccctggatggtt 1419

```

图 7

```

1374 TGAACGGTTTGGATGGTACAGATACGCATTACTTTCATAGTGGTTCACGC 1423
      |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1420 tgaatggttttgatggtactgatacacattacttccatggtggaccacgg 1469
1424 GGCCATCATTGGATGTGGGATTCTCGCCTTTTCAACTATGGGAATTGGGA 1473
      || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1470 ggtcatcactggatgtgggattctcgcctgttcaactatgggagttggga 1519
1474 AGTTCTAAGATTTCTACTATCCAATGCAAGATGGTGGCTCGAGGAGTATA 1523
      |||| ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || |||||
1520 agttttaagatatttactgtcgaatgcaagggtggtggcttgaagaataca 1569
1524 AGTTTGATGGTTTCAGATTTGACGGTGTAACCTCAATGATGTACACTCAT 1573
      ||||| ||||| || ||||| || || ||||| ||||| ||||| |||||
1570 agtttgatgggttttcgatttgatggggtgacctccatgatgtatactcat 1619
1574 CATGGATTACAAGTAGCATTACGGGGAACCTACAGTGAATACTTTGGATT 1623
      ||||| ||||| || ||||| || || ||||| || ||||| ||||| |||||
1620 catgggttacagggtggcatttactggcaactatggcgaatatatttggtt 1669
1624 TGCCACTGATGCTGATGCAGTAGTTTACTTGATGCTGGTAAATGATTTAA 1673
      ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1670 tgctactgatggtgatgcagtagtttacttgatgctggtgaacgatctaa 1719
1674 TTCATGGACTTTATCCTGAGGCCATAACCATCGGTGAAGATGTCAGTGGGA 1723
      ||||| ||||| ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1720 ttcatgggctttatcctgaggctgtagccattggtgaagatgtcagcggg 1769
1724 ATGCCTACATTTGCCCTTCCTGTTCAAGATGGTGGGGTTGGTTTTGATTA 1773
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1770 atgcccacattttgtattcctgttcaagatggtggtggtggttttgacta 1819
1774 TCGCCTTCATATGGCTGTTTCCTGACAAATGGATTGAACTCCTCAAGCAAA 1823
      ||| | ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1820 tcgtttgcatatggctgtaccggacaaatggatcgaactcctcaagcaaa 1869
1824 GTGATGAATCTTGGAAGATGGGTGATATTGTGCACACACTGACTAACAGA 1873
      |||| |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1870 gtgacgaatattggaaaatgggtgatatcgtgcacaccctaacgaataga 1919
1874 AGGTGGTCAGAGAAGTGTGTTACTTATGCTGAAAGTCATGATCAAGCACT 1923
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1920 aggtggtcagagaagtgtgttacttatgcagaaagtcatgaccaagcact 1969
1924 AGTTGGTGACAAAACCTATTGCATTCTGGTTGATGGACAAGGATATGTATG 1973
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1970 agttggtgacaagactattgcattctggttgatggataaggatatgtatg 2019
1974 ATTTTATGGCTCTGGACAGACCGGCAACACCTAGCATTGATCGTGGAATA 2023
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2020 attttatggctctagacagaccttcaacacctcgcatcggtgggata 2069
2024 GCATTGCATAAAATGATTAGACTTATCACAATGGGGTTAGGAGGAGAAGG 2073
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2070 gcattacataaaatgattaggcttgtcaccatgggcttaggaggcgaagg 2119

```

图 7

```

2074 CTATCTTAACTTTATGGGAAATGAGTTCGGACATCCTGAATGGATTGATT 2123
      ||||| || ||||| ||||| || ||||| ||||| |||||
2120 ctatcttaatttcatgggaaatgagtttgggcatcctgaatggatagatt 2169

2124 TTCCAAGAGCTCCACAAGTACTTCCAAATGGTAAATTCATCCCAGGGAAT 2173
      | ||||| || ||| ||||| ||||| || ||||| ||
2170 tccaagaggcccgcaaagtcttccaaatggctcggtcctcccaggaaac 2219

2174 AACACAGTTATGATAAATGCCGTCGAAGATTTGACCTGGGTGATGCGGA 2223
      ||| ||||| ||||| ||||| ||||| || ||||| ||
2220 aactacagttttgataaatgccgtcgtagatttgaccttgagatgcaga 2269

2224 CTATCTTAGGTATCGTGGCATGCTAGAGTTTGACCGCGCGATGCAGTCTC 2273
      ||||| |||| ||| |||| ||||| || | || ||||| ||
2270 ttatcttagatatcatgggatgcaagagtttgatcaggccatgcagcatc 2319

2274 TCGAGGAAAAATATGGGTTTCATGACATCAGACCACCAGTACATATCTCGA 2323
      | ||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||
2320 ttgaggaaaaatatggattcatgacatctgagcaccagtatatatcgcgc 2369

2324 AAGCATGAAGAGGATAAGATGATTATATTTGAGAAGGGAGATCTGGTATT 2373
      || || || ||||| |||| || || || || ||||| |||||
2370 aaacacgaggaggataaggtgatcatcttcgagagaggagatttggatt 2419

2374 TGTGTTCAACTTCCATTGGAGTAACAGCTATTTTGACTACCGTGTTGGTT 2423
      ||||| ||||| ||||| ||||| || || || |||||
2420 cgtgttcaacttccactggagtaatagctattttgactatcgcgtcggtt 2469

2424 GTTTAAAGCCAGGGAAATATAAGGTGGTCTTGGACTCAGATGCTGGACTC 2473
      ||||| || || || || || || ||||| || || || ||
2470 gtttaaagcctggaaagtacaagattgtgttgactcagacgatggcctc 2519

2474 TTTGGTGGATTTGGCAGGATCCATCACACTGCAGAGCACTTCACTGCCGA 2523
      ||||| || || || || || || ||||| || ||
2520 tttggtggattcagtcggcttgatcatgatgctgagtacttactgctga 2569

2524 TTGTTACATGACAAACAGGCCCTACTCGTTCTCAGTTTATTCTCCTAGCA 2573
      || | ||||| || || || || || || || || || ||
2570 ctggccgcatgacaacagaccatgttcattctcgggtgtacacccaagca 2619

2574 GAACCTGCGTTGTCTATGCTC 2594
      |||| | || || || || |
2620 gaaccgccgtcgtgtatgcac 2640

```

图 7



## riceSBEIIaIR.seq

```

1   CTCGAGTCTA  GATCGCGTC  G GTTGTTTA  AA GCCTGGA  AAG TACAAG  ATTGT
56  GTTGGACTC  AGACGATGGC  CTCTTTGGT  G GATTCAGT  CG GCTTGAT  CATGA
111 TGCTGAGT  A CTTCACTGC  TGACTGGCCG  CATGACAAC  A GACCATGT  TCATT
166 CTCGGTG  TA CACCCCAA  G CAGAACCGC  CGTCGTGTAT  GCACTTACA  GAGGA
221 CTAATG  ATC AGCTCTG  AT CATTGGGG  G AACAACTCA  AGGGAGTTGG  TGGTA
276 ATGAC  GCCG GAATAC  AAC TCAAGTG  AA AGGTGAAA  A GAAAGGCTGC  CCTGA
331 CGAT  GTGAT TTGAG  GGGC TTGTGT  TTC ATCGCCA  AT GCCAGGAAGA  TGAGG
386 TAG  AAAAGC CTAC  TGATG  AGCTC  CTGT TTTCGA  GTG ACTCGTGAAG  GAAAT
441 AG  ACCAGGG TGA  ACGGCT TTTT  TCAGA GCTAT  ACCA AACCCATCCT  ATGTT
496 G  CGCATTCG CT  GTAGTTT TGT  ACATAA CGAT  ATCGG TTGGCATTTG  TATGT
551 TTATGAATA  A TCTGTTCG AC  AGAAATG TTT  TTCTCC TTGTAAC TAG  TGAA
606 TTC

```

## riceSBEIIbIR.seq

```

1   CTCGAGTCTA  GNNNNNNNNN  N NNNNNNNN  NN NNNNNNN  NNN NNNNNN  NNNNN
56  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNN  N NNNNNNNN  NN NNNNNNN  NNNNN
111 NNNNNNNNN  N NNNNNNNNN  NNNNNNNNN  NNNNNNNNN  N NNNNNNNN  NNNNN
166 NNNNNNNN  NN NNNNNNNN  N NNNNNNNN  NNNNNNNNG  CTCCAGCGG  AATGA
221 GAACAC  CAA GAGGCAG  CA TGCAAGTG  T GTGCGGCTG  CTAGTGCGAA  GGAGC
276 AAGAA  AAAC TAGTTG  CCA GCAATCT  GT GAACGGCT  T TCCTAGGTTC  TGCTT
331 CGAT  GAATG CCGGA  TAGA CTAGAC  ANN NNNNNNN  NN NNNNNNNNNN  NNNNN
386 NNT  TGTAGT TTTA  GTTTG TGAGG  GAAA GAAACG  TTT ATTTGTAATT  ATCTG
441 TG  GCTGTCG AAC  GGCGAC GAAA  CCATG AACCC  CGTA TATTTGTTGG  TACCG
496 T  TCGAACTG CC  AGTTATA CAT  AGTTCT GCAC  TTCTG TACATCTTGT  GATGC
551 TACTAGTGA  A TTC

```

## riceSBEIIR.seq

```

1   CTCGAGTCTN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
56  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
111 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
166 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
221 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
276 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
331 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
386 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
441 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNN
496 NNNNNNNNNN  NNNNNNNAGC  ATCAGATTTC  TTGATCAGGA  GCAACTGTTG  GTGCC
551 CTTGTAAACT  AGTGAATTC

```

图 8